



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### Agradecimentos

- A uma pessoa muito especial que me levou até à faculdade e me inscreveu um minuto antes de a secretaria fechar.
- Aos meus pais pelo apoio incondicional.
- À prof. Dra. Margarida Gonçalves pelo tempo inesgotável que me deu durante o trajeto.
- À prof. Dra. Cristina Marques por me ter apoiado e acreditado em mim.
- À Karol e Marisa pela amizade que construímos.

A todos que gostam de mim.....



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### Resumo

Neste trabalho estudaram-se 12 amostras de própolis provenientes de diferentes regiões de Portugal. Estas amostras foram extraídas com soluções hidroalcoólicas a 70% (v/v) e a 96% (v/v), e obtiveram-se rendimentos de extração entre 35,2% (m/m), (P4, Algarve) e 91,6% (m/m), (P9, Vale do Mondego). Os extrato brutos foram avaliados pela reação de Folin-Ciocalteu, reação de sequestração do radical DPPH e determinação da atividade antioxidante de redução férrica. Registaram-se teores de compostos fenólicos totais no própolis bruto, expressos em equivalentes de ácido gálico, entre 70,0 mg/g (P3, Águeda) e 141,5 mg/g (P1, Mealhada/Buçaco), valores de atividade de sequestração do radical DPPH, expressa em equivalentes de ácido gálico, entre 12,7 mg/g (P4, Algarve) e 84,0 mg/g (P9, Vale do Mondego) e valores de capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP), expressa em milimoles equivalentes de sulfato ferroso/g entre 0,62 milimoles/g (P4, Algarve) e 2,46 milimoles/g (P7, Serra do Buçaco). As três atividades testadas apresentaram correlações fortes, no conjunto de amostras analisado. Os extratos brutos foram fracionados com hexano e acetato de etilo e estas frações foram caracterizadas por GC-MS. As propriedades funcionais da fração de acetato de etilo foram também determinadas tendo-se obtido resultados análogos aos registados para os extratos brutos. Identificaram-se tentativamente 18 compostos presentes em todas as amostras de própolis analisado exceto o própolis do Algarve e identificaram-se os componentes que mais diferenciam as diferentes amostras:  $\delta$ -selineno,  $\beta$ -eudesmol, rosifoliol, dihidrocrisina, crisina e crisofanol.

Os componentes do própolis cuja concentração apresenta uma correlação mais forte com a sua atividade antioxidante foram: a 3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno- [1,2b] -2-furanona, o ácido 3,4-dimetoxicinâmico, o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, o ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico, a tetocrisina, a dihidrocrisina, a crisina, o crisofanol e um dos derivados da crisina (pico nº16).

Finalmente determinaram-se quais os componentes que apresentavam maiores concentrações relativas nos extratos das diferentes amostras: a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, a dihidrocrisina, a tetocrisina, a crisina e o crisofanol



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### Abstract

This work studied 12 samples of propolis from different regions of Portugal. These samples were extracted with hydroalcoholic solutions of 70% (v/v) and 96% (v/v) and the extraction yields were of 35, 2% (w/w), (P4, Algarve) and 91,6 % (w/w) , (P9, Mondego Valley) . The crude extracts were analyzed by the Folin-Ciocalteu reaction, the reaction of sequestration of the DPPH radical and the determination of the antioxidant activity of ferric reduction. The levels of phenolic compounds in crude propolis, were expressed as gallic acid equivalents and varied between 70,0 mg/g (P3, Agueda) and 141,5 mg/g (P1, Aveiro/Buçaco); the values of the activity of sequestration of the DPPH radical were expressed as gallic acid equivalents, and varied between 12,7 mg/g (P4, Algarve) and 84.0 mg/g (P9, Mondego Valley); the values of ferric reduction antioxidant capacity (FRAP), were expressed as millimoles of ferrous sulfate equivalents/g and varied between 0,62 millimoles/g (P4, Algarve) and 2,46 mmol/g (P7, Buçaco Mountain) . The three activities tested showed strong correlations in the set of samples analyzed. Crude extracts were fractionated with hexane and ethyl acetate, and these fractions were characterized by GC-MS. The functional properties of the ethyl acetate fraction were also determined and the results obtained were analogous to the ones reported for the crude extracts. The tentative identification of 18 compounds present in all samples analyzed (except the propolis from Algarve) was performed and the components that most differentiate the different samples were identified as:  $\delta$ -selinene,  $\beta$ -eudesmol, rosifoliol, dihydrochrysin, chrysin and chrysophanol.

The components of propolis whose concentration has a strong correlation with their antioxidant activity were 3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-inden-[1,2b]-2-furanone, 3,4-dimethoxycinnamic acid, 3,4-metilenodioxycinnamic acid, 4-acetoxy-3-methoxycinnamic acid, tectochrysin, dihydrochrysin, chrysin, chrysophanol and one derivative of chrysin (peak No. 16).

Finally it was determined which components had higher relative concentrations in the extracts of the different samples: 2',6'- dihydroxy -4'- metoxichalcone, dihydrochrysin, tectochrysin the chrysin and chrysophanol.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Média da composição relativa e concentração de compostos bioativos analisados por GC-MS de várias regiões do Mundo .....	30
<b>Tabela 2</b> Composição de Compostos Bioativos analisados por HPLC-ESI -MS de várias regiões de Portugal.....	31
<b>Tabela 3</b> Codificação das amostras e indicação sobre origem e época e recolha.....	32
<b>Tabela 4</b> Representação da preparação da solução padrão utilizada no teste de FRAP	36
<b>Tabela 5</b> Descrição da origem geográfica e das datas de recolha das várias amostras de propolis incluídas neste trabalho .....	38
<b>Tabela 6</b> Rendimentos brutos de extração das amostras de própolis com etanol.....	42
<b>Tabela 7</b> Teores de compostos fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos, no própolis bruto e no extrato seco, expresso em equivalentes de ácido gálico.....	43
<b>Tabela 8</b> Atividade de sequestração do radical DPPH dos extratos hidroalcoólicos, do extrato bruto e do extrato seco, expressa em equivalentes de ácido gálico.....	45
<b>Tabela 9</b> Atividade antioxidante de redução férrica dos extratos hidroalcoólicos, do própolis bruto e do extrato seco, expresso em equivalentes de sulfato ferroso. ....	46
<b>Tabela 10</b> Coeficientes de correlação de Pearson das diferentes atividades avaliadas na solução de própolis, no própolis bruto e no extrato seco. ....	48
<b>Tabela 11</b> Teor de compostos fenólicos atividade de sequestração de DPPH e atividade antioxidante de redução férrica das frações de acetato de etilo obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos.....	52
<b>Tabela 12</b> Compostos tentativamente identificados nas frações de acetato de etilo correspondentes aos própolis P1 a P12 com exceção da amostra P4 .....	56
<b>Tabela 13</b> Áreas cromatográficas dos picos com maior relevância na caracterização e distinção das várias amostras de própolis por GC-MS.....	60



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

## Índice de Ilustrações

<b>Figura 1</b> Aspeto visual das amostras de própolis em bruto-----	39
<b>Figura 2</b> Aspeto dos extratos hidroalcoólicos dos propolis -----	40
<b>Figura 3</b> Perfis cromatográficos dos P3 E P4 -----	54
<b>Figura 4</b> Representação da estrutura de alguns Compostos -----	62
<b>Figura 5</b> Concentrações relativas dos principais componentes das amostras P1 a P12 com exceção da P4-----	63



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

## Índice

### Conteúdo

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract	3
INDICE DE TABELAS	4
Índice de Ilustrações	5
Índice	6
Capítulo 1 - Introdução	8
1.1. "Stress" Oxidativo abordagem fisiopatológica	8
1.2. Métodos de determinação da atividade antioxidante	9
1.3. Própolis	14
1.3.1. Características do própolis português	18
1.3.2. Própolis e atividade anti- microbiana	19
1.3.4. Estudo sobre a composição do própolis e sua bioatividade	21
1.4. Técnicas de Extração de compostos antioxidantes do própolis	24
1.4.1. Extração líquido-líquido	25
1.4.2. Outras técnicas de extracção	26
1.5. Métodos Cromatográficos de análise de componentes do própolis	26
1.5.1. Método Cromatográfico HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	26
1.5.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	27
1.5.3. Determinação de perfis cromatográficos de própolis nacional e de outras regiões	27
Capítulo 2 – Parte Experimental	32
2.1. Amostragem	32



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

2.3 Fracionamento dos extratos brutos por extração líquido-líquido -----	33
2.4. Medida de atividade antioxidante dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo-----	34
2.4.1. Pesquisa de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau --	34
2.4.2 - Teste de DPPH dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo -----	35
2.4.3. Teste de FRAP dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo-----	35
2.4. Preparação das amostras para análise em GC-MS -----	37
Capítulo 3 – Resultados e Discussão-----	38
Capítulo 4 – Conclusões -----	64
Capítulo 5- Bibliografia -----	69



## Capítulo 1 - Introdução

### 1.1."Stress" Oxidativo abordagem fisiopatológica

O "stress" oxidativo tem sido um tema muito abordado, e tem suscitado muito interesse, pela comunidade científica e pela comunidade em geral, devido á busca de vários elementos, que previnem doenças e episódios naturais como o envelhecimento.

Os radicais livres são átomos e moléculas, que quando produzidas em excesso causam danos nas células do organismo, mas em condições fisiológicas apresentam um papel importante (1), a nível das vias de transdução de sinal, transcrição genética, a nível cardiovascular, na hemodinâmica, no processo de neuro transmissão, (65),etc.

A exposição repetida a vários agentes patogénicos e situações de inflamação que evoluam para a cronicidade, que levem o aparecimento de diabetes, doenças neurológicas, renais, pulmonares e outras evoluem para eventos de "stress" oxidativo e nitrosativo (2).

O uso de antioxidantes traduz-se assim na tentativa humana de minimizar e melhorar a qualidade de vida.

O sistema de defesa antioxidante pode ser sucintamente caraterizado, de duas formas como o endógeno (3) e exógeno (4).

Do sistema endógeno, tal como o nome indica, fazem parte o ácido úrico, a bilirrubina, glutathione e tióis, metaloenzimas, NADPH e NADH. Deste sistema fazem parte as enzimas sequestradoras de radicais livres a catálase, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase.

Fazem parte do sistema exógeno a vitamina C (ácido ascórbico),vitamina E (tocoferol), carotenóides, compostos fenólicos, polifenóis, todos os antioxidantes provenientes da dieta.

E temos de ter em conta, as proteínas fixadoras de metais como a albumina, ceruloplasmina, ferritina, transferrina, mioglobina.





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### 1.2. Métodos de determinação da atividade antioxidante

Para se medir a capacidade antioxidante de uma amostra há que referir que não é correto usara apenas uma metodologia, pois as amostras biológicas são misturas complexas de vários antioxidantes, deve-se ter sempre em conta a natureza dos mesmos se são hidrofílicos ou lipofílicos e qual o seu mecanismo de reação.

Temos de ter em conta que, a medida da capacidade antioxidante se expressa em moles do radical sequestrado, da solução testada independentemente, da capacidade de cada antioxidante presente na mistura.

Segundo Somogy et al. (7) a interpretação das alterações na capacidade antioxidante no plasma depende não só do método utilizado, mas também da deteção dessas mudanças e nas condições sobre as quais, as capacidades antioxidantes do soro ou plasma, são determinadas.

Qualquer que seja a metodologia usada terá de ser criteriosa pois uma verdadeira medida ainda não é conhecida.

Os vários métodos disponíveis para fazer a medição da capacidade antioxidante e a sua análise podem ajudar a avaliar os vários fatores do meio ambiente, fisiológicos ou nutricionais que afetam o estado “redox” nos humanos.

Os princípios químicos com que são regidos os métodos de medida das capacidades antioxidantes, dependem do tipo de reações químicas envolvidas e podem ser classificadas de duas formas:

a) Ensaio baseado na transferência de átomos de H estas aplicam um esquema reacional elaborado competitivo em que cada antioxidante e substrato competem para formar radicais do tipo peróxido através da decomposição de compostos azo. Estes ensaios incluem indução ou inibição de auto oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, capacidade de absorvência do radical oxigénio (ORAC), TRAP, e ensaios de sequestração da crócina.

b) Ensaio baseado na transferência de eletrões estes medem a capacidade de um antioxidante na redução de um oxidante que muda de cor quando é reduzido.

O grau de mudança de cor é relacionado com a concentração de antioxidante nas amostras.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

As reações de transferência de eletrões compreendem a reação de medição dos compostos fenólicos totais pela reação do reagente de Folin - Ciocalteau (FCR), capacidade equivalente do Trolox (TEAC), poder antioxidante redutor do ião férrico (FRAP), “potencial antioxidante total” usando o complexo Cu (II) como oxidante e o DPPH.

A maior parte dos ensaios mede a atividade antioxidante numa razão micromolar pelo que os ensaios podem precisar de minutos ou horas para realizar.

O ensaio ORAC baseia-se na medição, da inibição antioxidante do radical peróxilo induzindo oxidações e traduz a clássica reação de atividade antioxidante de quebra da cadeia radicalar por transferência de átomos de hidrogénio.

Em termos básicos o radical péroxilo reage com um produto fluorescente para originar um produto que não emite fluorescência. Este método, apresenta limitações pois apenas considera a capacidade antioxidante contra radicais peróxilo e ignora os antioxidantes lipofílicos tão importantes contra a oxidação lipídica.

Tem-se desenvolvido alterações ao método, que visam reduzir estas limitações usando misturas de acetona e água para solubilizar os antioxidantes.

É um método facilmente automatizável e pode-se adaptar, quer seja para pesquisar antioxidantes hidrofílicos ou hidrofóbicos. Trata-se de um método muito sensível a diferenças de temperatura.

Requerem-se detetores de fluorescência que não são muitos facilmente encontrados em laboratórios de química analítica, e requerem longos tempos para a sua realização.

O método TRAP é um método que faz a monitorização entre a capacidade dos antioxidantes possuem de interferir com reações entre radicais peróxilo gerados por AAPH ou ABPAP (2,2'-azobis 2-amidinopropano dihydrochloride) e com uma prova alvo.

Este método é muito semelhante ao método ORAC mas os requisitos para este ensaio baseia-se na prova ter de ser mais reativa com os radicais peróxilo em concentrações mais baixas.

O método TRAP, é muitas vezes utilizado, para medir a capacidade antioxidante “in vivo” no plasma ou soro porque mede essencialmente antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico, alfa tocoferol, beta caroteno.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

O maior problema que apresenta é a difícil detecção do ponto final da reação, assume-se neste método que todos os antioxidantes possuem uma “lag fase” e que a “lag fase” é proporcional á concentração de antioxidante, e o contributo do antioxidante depois desta fase muitas vezes é completamente ignorado.

No método TOSC (capacidade sequestradora total oxidante) desenvolvido por Winston et. al. este método permite quantificar da capacidade de absorvância de antioxidantes especificamente contra três oxidantes que são radicais hidroxilo, radicais peróxilo e peróxinitrito.

Este método avalia por isso várias vias de formação de radicais no organismo, o substrato que é oxidado neste ensaio é o ácido alfa ceto metiolbútrico que forma etileno e o tempo de formação do etileno é monitorizado por método de cromatografia gasosa.

A medida da capacidade antioxidante é quantificada pela capacidade do antioxidante inibir a formação de etileno, relativamente a uma reação de controlo. Uma curva linear de dose resposta é obtida para os antioxidantes pode ser gerada da cinética da reação.

Quimiluminescência (QL) - este método surge da modificação da sensibilidade do método TRAP e é baseado nas reações de radicais oxidantes com compostos marcados para produzir espécies no estado excitado, que por sua vez emitem fluorescência (induzida por luz quimicamente) e qualquer composto que reaja com a inicialização dos radicais inibe a produção de luz.

Este método exige equipamento especial o que se torna uma limitação, a escolha do emissor de luz tem de ser criteriosa, o luminol é de longe o emissor mais utilizado.

Fotoquimioluminescência (Photochem) – comercializado pela Analytik Jena AG (Germany), neste ensaio existe a geração de radicais superóxido combinado com a detecção por quimiluminescência.

Este método, tem como limitações o elevado custo exige “kits” para ensaios hidrofílicos e lipofílicos, tem sido usado para medir a capacidade antioxidante em alimentos.

Das reações que envolvem transferência de eletrões destaca-se a medição do poder antioxidante do ião férrico (FRAP).

Neste método, que foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain é medida a capacidade redutora do plasma inicialmente e depois foi adaptado para medir antioxidantes no campo da botânica.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

A reação mede a redução do TPTZ (férrico2,4,6-tripiridyl-s-triazine) a um produto colorido.

Este método dá-nos uma ideia do grau de hidroxilação e da extensão da conjugação nos compostos polifenólicos. Mas não possui capacidade para detetar compostos que atuam por transferência de H particularmente tióis e proteínas.

Neste ensaio há que ter em consideração que os compostos polifenólicos possuem diferentes tempos para reagir, uns necessitam de mais tempo para que a reação se complete para reagir.

Tem que se ter em atenção que os compostos fenólicos poderão em certos casos se comportar como agentes pró oxidantes, em quantidades elevadas este fato tem sido adequado ao exemplo de algumas flavonas e flavononas.

Em comparação com outros métodos o método FRAP é simples, rápido, não se torna muito dispendioso e não requer instrumentação sofisticada e especializada. O ensaio pode ser automático, semiautomático e manual.

Ensaio de Redução do Cobre (Cuprac) este método é uma variante do método FRAP que em vez de utilizar ferro usa cobre no ensaio, e foi introduzido como Bioxytech AOP-490 e CUPRAC. Os ensaios baseiam-se no princípio de redução do CU (II) a CU (I) pela combinação de todos os antioxidantes (agentes redutores) na amostra.

No ensaio Bioxytech AOP-490 o composto batocuproina forma um complexo de 2:1 com o CU (I) resultando um cromóforo com máximo de absorção lido no comprimento de onda a 490 nm.

No método CUPRAC usa-se o composto neocuproina que reage com o CU (I) e que também absorve a 450 nm.

A curva de diluição, gerada pelo padrão de ácido úrico é usada para converter a absorção da amostra em equivalentes de ácido úrico.

As reações com o cobre apresentam vantagens em relação ao ferro pois, quase todas as classes de antioxidantes são mensuráveis de ser detetadas, incluindo os tióis com pouca interferência, e a reação cinética com o cobre é mais rápida.

O ensaio AOP-490 requer apenas 3 minutos, o ensaio CUPRAC é completo em minutos para o ácido ascórbico, ácido gálico e quercetina, mas para moléculas mais complexas é preciso 30 a 60 minutos.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Torna-se difícil o uso de cobre no ensaio numa mistura complexa devido á difícil seleção dos tempos reacionais.

Ensaio da 2,2-Diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH) - o radical DPPH constitui um dos radicais de azoto orgânicos mais estáveis que exhibe uma cor púrpura. Este ensaio é baseado na capacidade dos antioxidantes sofrerem redução perante o radical DPPH. Esta capacidade pode ser avaliada por ressonância de spin, ou medindo a diminuição da sua absorvância.

Os ensaios são baseados na medição da perda de cor do DPPH a 515 nm depois da reacção com os compostos a testar e a reacção monitorizada por espectrofotómetro. A percentagem remanescente é calculada através de uma fórmula e é proporcional á concentração de antioxidante.

Este método é simples, rápido e requer apenas um espectrofotómetro de UV-vis o que o torna um dos métodos mais utilizados na medida do poder antioxidante. Apresenta desvantagens pois o DPPH é descolorado por agentes redutores, como também pode sofrer transferência de H, o que pode contribuir para interpretações de resultados incorretas.

Reacção de Folin- Ciocalteau ou Método de Determinação de Compostos Fenólicos Totais - Este método é um pouco controverso, pois quando o realizamos não sabemos se estamos a medir apenas os compostos fenólicos ou se estamos também a medir compostos fenólicos com agentes redutores e quelantes.

Ao longo do tempo o método, que era apenas destinado a produtos naturais foi sendo melhorado e alterado.

O método original indica que, reagentes químicos usados, para análise da tirosina que em oxidação com fenóis pelo reagente molibdotungsténio, leva á coloração do produto a comprimento de onda máximo entre 745-750 nm.

É um método simples, sensível e preciso, no entanto a pH ácido a reacção perde sensibilidade.

Como desvantagens, este método apresenta o facto de outras substâncias poderem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteau como a adenina, guanosina, ácido ascórbico, creatinina, ácido úrico, etc.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### 1.3. Própolis

Da procura cada vez maior por suplementos alimentares, vitaminas e antioxidantes, surge o própolis de uso milenar devido às suas diversas propriedades e usado até como alternativa ao uso de fármacos, recentemente tentou-se encapsular o própolis com o propósito de saber poderia aplicar em situações de síndromes diabéticas, e parece haver resultados positivos no que diz respeito á descida da glucose do sangue, na modulação lipídica (44).

Os produtos de origem natural, ganham interesse cada vez maior junto da comunidade científica e população em geral devido às suas capacidades antioxidantes e respetivos benefícios a nível das doenças cardiovasculares e carcinogénicas, sendo estas consideradas “epidemias” a nível mundial (64).

Segundo Shigenori et al., (2010) (6) o própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas resultante da colheita de várias plantas, enriquecida com secreções salivares das mesmas, a sua composição depende do tipo de vegetação e área de colheita. Na colmeia o própolis tem a função de defesa da própria quando se faz a sua colheita o própolis apresenta-se como uma mistura de inúmeros componentes inclusive de componentes da própria colmeia.

A sua natureza resinosa, faz com que não seja possível o seu consumo no seu estado natural, atualmente opta-se por reduzir o própolis a pó e extrai-lo em meio etanólico ou aquoso (64).

A função do própolis é portanto manter a colmeia em situação de assepsia (55).

Vários estudos analisados por HPLC e GC-MS aos extratos etanólicos sugerem, que estes são constituídos por cerca de 55% resinas e balsamos, 30% ceras, 10% de ácidos e 5% de pólen (16). Os componentes são ricos em vitaminas, elementos minerais e enzimas, em adição existem ainda, ácidos gordos, aminoácidos, terpenos, flavonoides e derivados do ácido cinâmico (16).

As suas características e a sua composição variam muito com a vegetação da área de onde provém, da época do ano em que é obtido e do próprio estado do própolis (se é fresco ou antigo) (66).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Vários estudos, realizados através da avaliação da capacidade sequestradora (DPPH), indicam que, quase todos os componentes do própolis, apresentam capacidades antioxidantes. Inúmeras amostras foram já analisadas, e todas apresentam grande variedade de compostos antioxidantes tais como ácido cafeico, ácido ferrúlico. Os principais compostos são os fenólicos que quimicamente se caracterizam pela presença de grupos hidroxilo com ligação direta a um anel aromático.

Os flavonoides constituem uma espécie de marcador, visto que o que determina a existência de um própolis de qualidade numa dada região é a quantificação dos flavonoides totais (38).

Há muitos milénios que o própolis é utilizado em medicina, e é relatado como tendo variadas atividades biológicas tais como antibacterianas e antioxidantes, não se conhecem contra indicações em relação a este composto tão heterogéneo a não ser em pessoas que apresentem hipersensibilidade ao mesmo (25). Estudos recentes, confirmam as suas atividades como antisséptico, antimicótico, bacteriostático, adstringente, espasmolítico, anti-inflamatório, anestésico e antioxidante (29).

Parece que, o precursor do própolis característico da Europa é o exsudado do própolis poplar negro (*populus nigra*) muito abundante nas regiões centro e sul da Europa, com características químicas e farmacológicas relevantes, as substâncias químicas responsáveis por estas características botânicas são os flavonoides, os ácidos hidroxycinâmicos e os seus ésteres (55).

O própolis pode encontrar-se já presente em várias formulações, quer seja em cápsulas, “sprays”, loções e até dentífricos dadas as suas atividades antimicrobianas e a sua compatibilidade excelente com os tecidos humanos, no entanto tem sempre de se ter em conta que existe uma concentração correta a cumprir, muito usada em formulações para minimizar síndromes gripais e constipações (13), problemas cutâneos como herpes, e até nos genitais se torna efetivo (13). Também se torna efetivo se for utilizado como adjuvante de vacinas (16), a presença do própolis nestas preparações confere-lhes uma viscosidade reduzida, boa estabilidade, baixa reatividade e baixa toxicidade, estes fatores fizeram com que, em 2005 o uso de própolis desta forma fosse possível (16).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Os flavonoides presentes no própolis fazem com que seja tão rico, compõem um grupo de compostos de fito nutrientes que são polifenóis de baixo peso molecular encontrados em plantas foto sintetizadoras apenas, e são responsáveis maioritariamente pela atividade antioxidante, mas juntando-se á sua atividade antimicrobiana faz com que possa ser utilizado na indústria alimentar com sucesso (24).

Dados literários sugerem, que existe uma maior suscetibilidade à ação do própolis as bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas.

Este composto atua a nível do crescimento e na divisão celular dos microrganismos.

Segundo Ivona Jasprica et al., (2007) para além das conhecidas propriedades anti-inflamatórias antioxidantes, e hepatoprotetoras e quimioprotetoras, o própolis pode apresentar efeitos pró-oxidantes e efeitos tóxicos crónicos senão forem respeitadas as doses de segurança estabelecidas. As doses utilizadas em animais em laboratório da ordem dos 200 a 5000 mg/kg/peso corporal/dia não causaram morte nos mesmos, se for aplicado o fator 1000 de segurança para os humanos, a dose de segurança passa a ser de 1,4 mg/kg/peso corporal/dia ou aproximadamente 70 mg/dia.

Até há pouco tempo, não se conheciam efeitos tóxicos ao própolis, recentemente atribuem-se efeitos de hipersensibilidade a este produto a alguns indivíduos mais sensíveis e a apicultores mas já existem estratégias para minimizar este fato, que consiste em realizar uma bio transformação bacteriana no mesmo, sem que sejam alteradas as suas propriedades, e utilizando-se microrganismos “seguros” do ponto de vista alimentar com efeito probiótico (40).

O própolis exerce uma função antioxidante conhecida “in vitro”, no entanto muitas limitações se colocam quando se tenta transpor os dados obtidos nos mesmos para testes realizados” in vivo” pois os efeitos benéficos dos compostos polifenólicos que o compõem poderá não ser necessariamente devido às suas propriedades sequestradoras de radicais mas poderão sofrer influência da expressão génica e das cascatas de sinalização celular, e que em certos casos poderão exercer um efeito pró-oxidante.

Nestes estudos convém fazer o estudo de outros parâmetros bioquímicos e hematológicos pois segundo Ivona Jasprica et al. (2007) vários parâmetros sofreram alterações durante os estudos, tais como o número de células vermelhas, a concentração de hemoglobina, o volume corpuscular médio e diferenças desses valores entre sexos.





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

É extremamente difícil caraterizar o própolis e identificar todas os seus componentes pois como já se referiu anteriormente, a composição dos seus constituintes influencia as suas propriedades, que por sua vez está relacionada com a proveniência geográfica do mesmo. Citando exemplos a resina o própolis proveniente da China e Europa contém predominantemente flavonoides e produtos secundários dos ésteres os ácidos fenólicos, o própolis iraniano contém muitos ácidos aromáticos ésteres do ácido cafeico, ácido cumarínico, etc. O própolis do Brasil já possui características muito diferentes (10).

Os flavonoides e os ácidos fenólicos constituem a maior classe de compostos fenólicos, cuja relação estrutura versus atividade antioxidante faz com que seja muito interessante, no que diz respeito á interação com sistemas hidrofílicos e lipofílicos. As atividades farmacológicas destes compostos derivam das suas caraterísticas antioxidantes (10).

Os polifenóis derivam da nossa dieta e possuem um espectro alargado de benefícios a nossa saúde, principalmente a nível cardiovascular, estas ações envolvem mecanismos específicos e não específicos. No que se refere aos não específicos, estes requerem elevadas concentrações de polifenóis para poderem ser efetivos nos tecidos já os mecanismos específicos existe a necessidade de haver interação entre polifenóis selecionados e proteínas particulares (11).

Os flavonoides constituem um grupo de fitoquímicos presentes em vários tipos de plantas em grandes quantidades, baseando-nos no seu esqueleto podem ser classificados em oito categorias flavanos, flavolonas, isoflavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas e flavonoligandos (57). As flavonas, são geralmente responsáveis pela pigmentação das flores, pela cor amarela ou vermelha/azul.

A sazonalidade representa, um fator muito importante nas características do própolis, e é aconselhável que sejam estudadas durante algum tempo, a origem botânica, efeitos anti proliferativos e anti oxidantes, pois variando estas variáveis assim se poderão encontrar resultados completamente diferentes, como exemplo se destaca um trabalho realizado, durante um ano no México, em que todas as amostras apresentaram atividade anti oxidante independentemente da altura do ano em que foram colhidas, no entanto o que diz respeito á atividade anti proliferativa já não se verifica esta situação (36).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### 1.3.1. Caraterísticas do própolis português

O própolis português possui caraterísticas muito semelhantes às espécies que se desenvolvem em climas temperados como as flavonas, flavononas, ácidos cinâmicos e os seus ésteres (39). No entanto, existem outros compostos pouco estudados, de várias regiões de Portugal, que parecem ser interessantes no que diz respeito às suas funções como atividade anti tumoral e antioxidante.

Alguns flavonoides como a quercetina do própolis da zona dos Açores, mostra ter efeito citotóxico em células tumorais, outro flavonoide mostra ter efeito vincado na apoptose.

Parece que, o própolis português tem características importantes como anti cancerígeno atuando como anti proliferativo e indutor da morte celular, mas também atua no metabolismo glicolítico das células cancerígenas (39).

O própolis português apresenta um perfil de compostos fenólicos com marcadas diferenças em concentrações, todas as regiões são igualmente ricas em flavonoides, mas mais evidente na zona centro interior, Sul e Madeira. A composição poplar de um própolis caraterístico das zonas temperadas é possível encontrar-se na zona Norte, costa Central e Açores, já o do centro interior e sul é rico em derivados do kaempferol (42). Este fato, pode constituir uma via de distinção entre os vários própolis, as várias regiões e consequentemente as suas atividades (42).

A qualidade do própolis é na maior parte das vezes avaliada pelas caraterísticas organoléticas e físico-químicas (49).

A avaliação da cor, normalmente é utilizada para fins comerciais, e adotada pelo sistema CIELAB, e traduz-se numa maneira rápida de reconhecimento do própolis, e desse reconhecimento, resulta a classificação de própolis, um deles o poplar caraterístico de regiões temperadas muito bioativo, logo muito rico em compostos fenólicos e um outro tipo com coloração mais escura, menos rico nesses compostos e portanto menos ativo (49).

Neste momento, não existem muitos estudos que englobem o própolis português, no entanto, os que existem são consensuais no fato de na região Norte se apresentarem mais ricos em compostos polifenólicos que os da região Sul (50).

Uma maneira de se avaliar a ação do própolis, é observando a sua capacidade para inibir a produção de produtos resultantes da peroxidação lipídica e hemólise oxidativa em



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

eritrócitos humanos, estudos realizados com própolis recolhidos de várias zonas do país, mostram que possuem fortes capacidades antioxidantes, principalmente da zona do Fundão (51).

Existem poucos estudos realizados sobre a caracterização e quantificação de compostos fenólicos de própolis português, existe apenas um artigo que nos dá alguma informação sobre este assunto, e que após avaliação de 40 amostras de própolis de Portugal continental e ilhas, por LC – DAD – ESI – MS sugere que, o mesmo apresenta características do própolis do tipo poplar, muito comum das zonas de clima temperado, mas em algumas amostras, foi possível detetar desvios no perfil de fenólicos exibindo “novos” compostos derivados do flavonol kaempferide (79). Este fato, vem indicar que, para além das espécies botânicas do género *Populus* em redor dos vários apiários, responsáveis pelo perfil fenólico característico, existirão outras espécies de coníferas, responsáveis pela variabilidade de resina e pela presença de flavonoides glicosídeos que torna a avaliação do própolis português muito difícil (79).

Tem havido algum interesse em estudar o própolis português, e verificar a sua atuação a nível de doenças do foro neurológico, obtendo-se alguns resultados satisfatórios e moderados quando se aplicam extratos etanólicos de própolis originário da zona nordeste, contra os efeitos citotóxicos induzidos pela staurosporina e peróxido de hidrogénio em culturas primárias de neurónios corticais, sendo estes dois fenómenos indutores de “stress” mediante vários eventos como a produção de espécies reativas de oxigénio e a ativação da caspase-3 (apoptose e morte celular) (82). Serão requeridos mais estudos a este nível, para se poder definir esta característica do própolis português e dos seus constituintes em particular uma vez que este exhibe características similares ao própolis das zonas de clima temperado tal como o própolis oriundo da China (que apresentou capacidade moderada a nível neuronal) contrariamente aos das zonas de clima tropical (82).

### 1.3.2. Própolis e atividade anti- microbiana

O própolis é um dos “antibióticos naturais” mais potente que se conhece, e apresenta um espectro de ação alargado, não induz resistências e nem destrói a flora microbiana normal. Também possui uma importante ação fungicida, sendo importante contra



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

*Cândida Albicans*, *Aspergillus Níger* (13), etc. Vários autores, referem também a atividade anti parasitária deste produto, “in vitro” o própolis parece ter uma atividade direta contra os microrganismos e “in vivo” tem ação estimuladora do sistema imunitário ativando os mecanismos de destruição dos mesmos (17). Poderá também exercer um efeito sinérgico com outros fármacos, nomeadamente antibióticos tornando-se interessante no desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo com a ciprofloxacina existe possibilidade de se combinarem para fazer face a infeções por estafilococos aureus dermatitis. Diminui a resistência das bactérias aos antibióticos que atuam na parede celular (ampicilina, amoxicilina, cefalexina), e também agem com os que interagem com as ribossomas (cloranfenicol, tetraciclinas, neomicina), mas não parece ter efeito nos que atuam no ADN e a nível do ácido fólico (cotrimoxazole) (17). A atividade antimicrobiana do própolis está intimamente ligada com os compostos químicos que o constituem, tem-se em conta a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas (14), atuam sobre o ARN polimerase ou a nível da estrutura química da parede celular.

Como a composição química do própolis, varia intimamente com a origem botânica e a geográfica a sua ação microbiana será diferente, se avaliarmos estes parâmetros para zonas diferentes geográficas (14). Por exemplo um estudo realizado com extratos de própolis da região da Colômbia, em que foram investigadas apenas, algumas características físico – químicas, e chegou-se á conclusão que os mesmos apenas apresentavam atividade anti microbiana contra *S. Aureus* e *E. Cóli* e nenhuma atividade contra *C. Albicans* (19), o que demarca este fato da localização geográfica estar intimamente relacionada com as suas características e atividade.

Apresenta atividade antimicrobiana contra, bactérias gram-positivas como o (*S. aureus*) e bactérias gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*) (24).

Normalmente o própolis é utilizado em soluções etanólicas, o que faz com que, os seus compostos fenólicos sofram alterações estruturais e precipitações, estas poderão ocorrer quando alguns flavonoides são dissolvidos em solventes orgânicos e provocam diminuição do contato entre as células bacterianas e as moléculas dos flavonoides. Desse fato pode resultar falsos positivos e (ou) negativos, quando os testes se reportam á atividade antimicrobiana (24), no entanto as discrepâncias dos resultados poderão



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

dever-se ao método microbiológico de difusão, que normalmente se utiliza, nomeadamente (i) tamanho do inóculo, (ii) volume e tipo de agar, tamanho dos discos, (iii) período de incubação (24).

Recentemente realizaram-se estudos a nível da indústria têxtil, com a finalidade de se incluir o própolis nos tecidos de algodão e “aproveitar” a sua propriedade anti microbiana fazendo uso de um agente de “cross-linking”. Várias variáveis estão a ser estudadas com sucesso para se obter tecidos com poder antimicrobiano, repelente de água e com proteção contra radiação UV sem comprometer o curso de fabrico normal do algodão (31).

A nível antibacteriano está comprovada a sua eficácia, como antiviral já se recomendado o seu uso em conjunto com outros compostos principalmente em formulações tópicas (32).

Mais recentemente, tem-se “apostado” no uso do própolis como uma substância alternativa ao uso de antibióticos, fazendo este parte de um grupo de substâncias com capacidade de controlar o viruloma bacteriano, existem evidências que cada agente anti patogénico deste grupo pode atingir um fenómeno, que ocorre nos agentes patogénicos (ex. *Pseudomonas aeruginosa*), que se designa por quórum sensing (QS) com algum sucesso (80).

### **1.3.4. Estudo sobre a composição do própolis e sua bioatividade**

É sabido, que o própolis apresenta um leque muito vasto de compostos bioativos, por esse motivo pode ser considerado um bom produto para se utilizar em medicina alternativa (59), mas consiste numa matriz complexa, na qual se podem encontrar compostos fenólicos e seus ésteres, flavonoides como flavonols, flavones, flavonones, dihidroflavonols, chalcones, terpenos, beta esteróides, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, quinonas, coumarínicos e compostos inorgânicos (62,63).

De um modo resumido, os compostos presentes no própolis com bioatividade podem ser encontrados no grupo dos flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos diterpénicos e compostos fenólicos (80).

A riqueza de compostos bioativos, está interligada com a região da sua proveniência e consequentemente do tipo de vegetação presente, pois as abelhas ao fazerem a recolha



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

do mel vão “colher”, obrigatoriamente compostos típicos em maior ou menor concentração, daí haver uma grande dificuldade em padronizar os mesmos e utilizar o própolis em formulações farmacológicas (76).

O tipo de vegetação e de clima faz variar a bioatividade do própolis, como exemplo em zonas temperada (Europa, Ásia, América do Norte), a espécie predominante é do género *Populus* em que predominam os flavonoides pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina e cafeatos, já em zonas de clima tropical (ex.: Brasil) a predominância de bioativos já é de ácidos p-coumarínicos, ácidos diterpénicos e acetofenonas preniladas (76).

Os flavonoides são dos constituintes do própolis mais abundantes, e que conferem a este composto as suas propriedades de bioatividade a nível das funções fisiológicas.

Dos vários estudos realizados, e das várias análises e identificações pela técnica de GC-MS, de diversos tipos de própolis e de vários locais do Mundo, chega-se á conclusão que o flavonoide mais representativo é a pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanone), e foi dos primeiros flavonoides isolados de plantas de variadíssimas espécies da família Piperaceae, e também é possível ser biossintetizada, nos espectros de MS o ião molecular característico é detetado em espectrometria de massa, com um valor de  $m/z$  256.394 (67,68).

Provavelmente, a nível estrutural, sendo a pinocembrina uma flavonona, a sua atividade biológica deve-se ao posicionamento dos grupos hidroxilo na molécula.

Este flavonoide maioritário do própolis tem como funções ser eficaz como antioxidante, anti carcinogénico, anti inflamatório, faz diminuir os níveis de colesterol no sangue, protege as paredes do endotélio vascular, e dados recentes mostram que o uso de uma terapia combinada de pinocembrina e o medicamento sinvastatina (antilipidémico), traz vantagens a nível da diminuição do processo aterosclerótico, em situações de isquemia/reperfusão cerebral “alivia” e evita danos e entrada de moléculas no cérebro, talvez porque nestas situações exista uma cascata de reações negativas tais como, um excesso de produção de radicais livres (67,68,89).

Nas regiões em que a concentração em pinocembrina é maior, existe uma grande contribuição para a percentagem em flavonoides totais e consequentemente aumento das atividades antimicrobianas, antioxidantes, (77) etc.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

A pinocembrina, galangina e pinobanksina como flavonoides que são possuem marcados efeitos antimicrobianos, principalmente contra bactérias gram positivas (87).

A pinocembrina, e ou seus análogos, devido ao fato de possuírem estas características, faz com que passem a constar da lista de novas substâncias promissoras a nível farmacológico, parece haver estudos que indicam que os mesmos poderão ser incluídos em nano partículas e obter-se alguma estabilidade em formulações (17).

Outro flavonoide maioritário do própolis é a pinostrobina chalcone, que apresenta grande função no que diz respeito à diminuição do “stress” oxidativo, pois protege as células da peroxidação lipídica e outros efeitos nefastos que as espécies reativas de oxigénio provocam no organismo, e até protegem células dos efeitos secundários de medicamentos (70).

Outro flavonoide muito característico e normalmente abundante no própolis é a pinostrobina (5-hidroxi-7-methoxiflavanone), de origem natural é-lhe atribuído uma série de funções de entre quais: bom agente antiespasmódico, anti ulceroso, anti flatulente, anti inflamatório, anti-nocieptivo, anti fúngico e parece influenciar a atividade das enzimas antioxidantes (81).

A crisina também está representada no grupo dos flavonoides, presentes no própolis e também responsável pelas funções de bioatividade no organismo sendo um potente agente antioxidante, anti cancerígeno, anti-inflamatório e inibidor da aromatase. A sua função como agente anticancerígeno é demonstrada, em estudos realizados “in vivo” em ratos nos quais se demonstra que, a crisina administrada numa dose de 90 mg/kg/dia, mostra ser eficaz na inibição no crescimento de tumores (83). Dados recentes poderão suportar a ideia que esta substancia administrada oralmente pode vir a incorporar um suplemento diário anti cancerígeno (83).

A quercetina e o ácido gálico estão presentes em quantidades significativas em própolis de zonas temperadas (Brasil), e são-lhes atribuídas as funções de moduladores da parede endotelial e anti angiogénicos (86).

A nível das atividades anti-inflamatórias, que os própolis de várias regiões demonstram ter, estas são atribuídas a vários elementos bioativos do própolis, como a acetina, naringenina, quercetina, que juntamente com o fenil éster do ácido cafeico (CAPE), formam uma boa linha de combate contra a inflamação inclusivamente artrites (87).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

A classe dos compostos aromáticos, também assume papel importante a nível da importância dos compostos químicos do própolis para o organismo, de entre elas encontram-se as funções como antissépticos, anestésicos, antirreumáticos, antipiréticos (88).

Existem no própolis compostos, que embora não apresentem atividade antioxidante ou outro tipo de atividade biológica no organismo, apresentam efeito sinérgico por exemplo os compostos terpénicos que aumentam a atividade anti microbiana do própolis, não sendo eles próprios os responsáveis por essa função (58).

### 1.4. Técnicas de Extração de compostos antioxidantes do própolis

Vários estudos mostram que, a técnica de extração dos componentes do própolis e os solventes utilizados exercem grande influência na composição e subsequente atividade microbiana do própolis (20), e que o melhor solvente para extrair os compostos bio ativos é o etanol entre percentagens de 50-70 %. Pode-se observar, através de estudos, que a composição química dos extratos de própolis e a sua atividade antioxidante variam não só com a concentração de própolis, mas também com o teor água/álcool do etanol hidratado utilizado no processo de extração (41).

De acordo com os estudos realizados, os extratos de própolis representam uma fonte rica de polifenóis e flavonoides do ponto de vista funcional, uma extração eficaz destes compostos está intimamente relacionada com o respetivo tempo de extração (28).

De acordo com a literatura, o tempo ótimo de extração ronda os cinco dias à temperatura ambiente (28).

O método tradicional (maceração) torna-se muito pouco prático pois, requer muito tempo para ocorrer, entre dois a dez dias. Atualmente tem-se assistido ao desenvolvimento de técnicas mais eficientes de extração de compostos orgânicos de matrizes sólidas, como a extração assistida por micro-ondas (MAE), ou extração ultra por ultrassons (UE) (23). A técnica de MAE utiliza o benefício do uso da energia de microondas para aquecer os solventes em contato com a amostra numa ordem e partição, o benefício da UE traduz-se nos efeitos mecânicos da cavitação acústica, ambos implicam





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

menos trabalho e menor tempo de execução, mas a técnica de UE mostra ter maior seletividade (23).

### 1.4.1. Extração liquido-liquido

Genericamente, entende-se por extração o método experimental que se utiliza para obter componentes de uma mistura sólida ou solução, e desempenha uma função importante em química analítica no que diz respeito á preparação de uma amostra (61).

As técnicas de extração têm sido melhoradas ao longo dos tempos, no que concerne ao encurtamento dos tempos de operação, diminuição do consumo de solventes orgânicos, aumento de eficiência do processo e diminuição de custos e poluição ambiental (61).

Quando referimos a técnica extração liquido-liquido, estamos a definir a operação de transferência de massa, em que existe uma solução líquida, que contém inicialmente um ou mais solutos (alimentador), e que é colocado em contato com um líquido imiscível (solvente). Os solventes possuem afinidade preferencial, para um ou mais componentes do alimentador e exibe diferentes densidades (26).

Os solventes mais utilizados são o etanol e o metanol acidificado, tendo em conta alguns trabalhos já realizados, parece que esta última opção é mais efetiva, no entanto, na indústria alimentar o uso de etanol é preferido, devido á toxicidade do metanol (26). As soluções etanólicas poderão, no entanto, levar a reações alérgicas em indivíduos suscetíveis (64). Em relação aos extratos metanólicos, apesar da sua toxicidade já referida, estes mostram ser mais concentrados em alguns compostos, como flavonóides e flavonóis, mas de consumo impróprio (64).

Vários estudos realizados, têm mostrado, que o uso de água alcalina (pH=8), podem conduzir a bons resultados se forem utilizados como alternativa às soluções etanólicas, não comprometendo os parâmetros a nível da atividade antioxidante (28).

Estudaram-se os possíveis efeitos tóxicos das soluções etanólicas de própolis em ratos de laboratório, e verificou-se que as mesmas, não causaram mortalidade ou sinais de toxicidade quando administradas oralmente, em doses acima de 5g/kg, dadas sucessivamente durante 8 semanas, não causam danos a nível do fígado e rim (30). Como se referiu anteriormente, as soluções etanólicas são vantajosas para dissolver o



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

própolis e extrair compostos, mas quando utilizadas na identificação de compostos por cromatografia gasosa pode funcionar como um fator de interferência, pois uma grande percentagem de açúcares passam para a solução depois de se adicionar o etanol, por isso há quem utilize como solvente de extração o dietiléter (73).

### 1.4.2. Outras técnicas de extração

As técnicas convencionais de extração como, o aquecimento, fervura e refluxo também se podem usar para extrair compostos fenólicos naturais, mas apresentam muitas desvantagens, pois podem conduzir á ionização, hidrólise e oxidação durante o processo. Ao longo dos tempos, tem-se desenvolvido outras, como a extração de fluidos supercrítica e extração a alta pressão hidrostática (HPE) e a extração enzimática assistida (26).

Destas novas técnicas, a extração a altas pressões conduz a resultados bastante satisfatórios, no que diz respeito a produtos de origem natural, que normalmente são bastante ricos em fitoquímicos biologicamente ativos (61). Com esta técnica, consegue-se realizar operações de transferência de massa por mudanças de gradiente e difusão causando dano nas membranas celulares das plantas e um aumento na permeabilidade, e logo um incremento da entrada de solvente no interior das células (61).

## 1.5. Métodos Cromatográficos de análise de componentes do própolis

A cromatografia trata-se de um método que envolve uma série de processos de separação de misturas, e acontece pela passagem da mesma através de duas fases uma fixa (estacionária) e uma fase móvel (15).

### 1.5.1. Método Cromatográfico HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

A cromatografia a liquido precisa que exista solubilidade das amostras na fase móvel e uma interação com a fase estacionária (15).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

É possível detetar, alguns compostos fenólicos mais comuns do própolis pela técnica de HPLC, entre eles destacam-se, a rutina, a quercetina, a naringenina, o kaempferol, a baicalina, a acacetina, o crisina e a galangina, de uma maneira generalista e quando se utiliza etanol como solvente (24).

### **1.5.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa (GC-MS)**

Na cromatografia gasosa, a amostra é injetada no topo de uma coluna cromatográfica.

A eluição realiza-se fazendo-se passar um fluxo de um gás inerte, que funciona como fase móvel, neste tipo de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas da amostra, a sua função é transportar a mesma através da coluna. Os gases utilizados para o efeito são o hélio, o azoto e o hidrogénio, a escolha dos mesmos depende da disponibilidade, pureza, consumo e o tipo de detetor utilizado (47).

Em termos de comparação de utilidade, a cromatografia gasosa associada a um detetor de massa torna-se um instrumento analítico mais eficaz que o HPLC, devido ao fato de existirem mais dados registados e descritos, no primeiro caso, no segundo a literatura exigente (tempos de retenção) é pobremente conhecida (54).

Como se referiu anteriormente, as soluções etanólicas são vantajosas para dissolver o própolis e extrair compostos, mas quando utilizadas na identificação de compostos por cromatografia gasosa pode funcionar como um fator de interferência, visto haver uma grande percentagem de açúcares passam para a solução depois de se adicionar o etanol (73).

### **1.5.3. Determinação de perfis cromatográficos de própolis nacional e de outras regiões**

Como já foi referido anteriormente, a composição química, caraterização do própolis e consequentemente a sua atividade, depende não só da zona geográfica de onde provém, da altura do ano em que é recolhido, mas também de fatores inerentes á fase analítica.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Os dados publicados sobre identificação de compostos em própolis, por GC-MS, HPLC, LC-MS, mostram toda uma heterogeneidade e abundância, que de uma forma simplificada se encontra representada nas tabelas nº 1.1 e nº 1.2 abaixo representadas.

A identificação de compostos baseia-se normalmente, na sua comparação com bibliotecas e literatura publicada por outros autores.

Como se encontra representado, os perfis de própolis em Portugal são muito pouco conhecidos, existem ainda pouca literatura para se poder obter uma fonte segura de comparação com os perfis reais, aparentemente é um perfil parecido com o perfil de própolis de climas temperados com exceção de algumas amostras da região da Madeira e da zona interior Centro, as quais são mais pobres em flavonoides, contrariamente ao que seria de esperar. Além disso, é possível encontrar novos compostos derivados da quercetina e kaempferol, derivados esses glucosilados, que segundo o autor S. I. Falcão e colaboradores indicam, os mesmos existem nas espécies circundantes ao apiário, mas que não sofrem transformação pelas enzimas salivares das abelhas, tendo sido esta situação já descrita por Popova e colaboradores.

Em relação ao própolis de outras regiões do globo, estas são um pouco mais estudadas, os vários autores normalmente, relacionam as propriedades químicas e antioxidantes com identificação de compostos, quer seja por HPLC, GC-MS, LC entre outras, e comparam esses dados com estudos de outros autores.

Na tabela nº 1.1 está bem patente a distinção e as diferenças de composição entre algumas zonas distintas do Mundo, em que se destaca o flavonoide pinocembrina como sendo maioritário dentro da sua classe, os silbenoides que se encontram em zonas muito restritas, na zona da América do Sul destaca-se a predominância de compostos aromáticos, mas ainda assim numa proporção muito menor que os flavonoides e de sesquiterpenos.

As quantificações de compostos normalmente são apresentadas na ordem dos mg/g, ou em percentagem, o que indica que quantidades muito pequenas dos compostos bioativos produzem efeitos relevantes a nível da função do própolis e das suas características.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes  
com relevância fisiológica



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 1 Média da composição relativa e concentração de compostos bioativos analisados por GC-MS de várias regiões do Mundo**

Compostos		Região/Concentração de Compostos (mg/g)									Ref's
		Nova Zelândia	Croácia	Ucrânia	Rússia	África	Argentina	Brasil	Grécia	Índia	
Pinocembrina	Flavonoides/Chalconas	7,0	8,8	5,0	5,5	Normal	9-75	Pobre	18%	Normal	Lcrécia L. Chaillou et. al., R. K. Markham et. al., Valery A. Isodorov et. al., Tong Zhang et. al., Cristiane Meneghelli et. al., N. Kalogeropoulos et al, R. Thirugnanasampandan et. al.
Crisina		3,9-5,0	7,7	3,8	4,8	Normal	-	Pobre	4,5%	Normal	
Pinostrobrina Chalcona		-	0,1	0,6	-	Normal	-	Pobre	33,74	Normal	
Pinobanksina		3,0	5,3	1,0	2,8	Normal	-	Pobre	6,21%	Normal	
Pinobanksina- 3-Acetato		8,6	8,6	2,9	8,9	Normal	-	Pobre	8,97%	Normal	
Galangina		3,8	9,1	0,8	5,0	Normal	-	Pobre	-	Normal	
Quercetina		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	0,8-73	Rica	0,3%	Rico	
Kaempferol		-	0,6	16,6	0,2	-	0,03-20,3	-	0,88%	-	
Ác. Cinâmico	Ácidos cinâmicos							Rico	0,76%	-	
Ác. Ferrúlico		0,03-0,22	0,9	0,2	0,3			Rico	0,42%	-	
Ác. P Coumarinico		0,08-0,33	1,5	14,9	13,7	-	-	Rico	2,85%	-	
Sesquiterpenos Triterpenos	Outros	-	-	0,6	16,2	10,2	Elev.	Elev.	28%	-	
Ácidos Gordos		0,25-0,78	-	-	-	-	-	-	-	Rico	
Stilbenóides		Não	Não	Não	Não	Elev.	Não	Não	Não	-	



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 2 Composição de Compostos Bioativos analisados por HPLC-ESI -MS de várias regiões de Portugal**

Compostos		Composição Média/Região						Literatura
		Norte			Sul	Açores	Madeira	S. I. Falcão et. al.
Pinocembrina Crisina Pinostrobin Chalcona Galangina Kaempferol	Flavonoides/Chalconas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Algumas zonas com perfil pobre	
Pinobanksina		Normal	Pobre	Normal	Normal	Normal	Normal	
Ác. Benzoico	Compostos Aromáticos	% Peq	% Peq	% Peq	% Peq	% Peq	% Peq	
Ác. Ferrúlico		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
Ác. Cinâmico		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
Quercetina, Kaempferol e derivados		Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	



## Capítulo 2 – Parte Experimental

### 2.1. Amostragem

Dispomos de 12 amostras de própolis recolhidas de várias zonas do país, e em alturas diferentes do ano, devidamente acondicionadas em recipientes próprios ao abrigo da luz e do calor, apresentam-se com aspeto resinoso, pegajoso e com colorações que variam entre o amarelo, castanho e o castanho muito escuro, foram atribuídos códigos, como se esquematiza na seguinte tabela:

**Tabela 3 Codificação das amostras e indicação sobre origem e época e recolha**

<b>Amostra</b>	<b>Origem Geográfica</b>	<b>Recolha</b>	<b>Observações</b>
P1	Mealhada/Buçaco	Abril 2013	Recolha em tela (Choupo)
P2	Vagos	Fevereiro 2013	Antes da Primavera (Sem choupo)
P3	Águeda	Abril 2013	
P4	Algarve	Abril 2012	
P5	Vagos	Abril 2013	Com choupo
P6	Montemor-o-Novo	Agosto 2012	Cardo Estrelado
P7	Serra do Buçaco	16/6/12	Com choupo
P8	Lezíria do Ribatejo	16/6/12	
P9	Vale do Mondego	Junho 2012	Com choupo
P10	Vila Real I	21/6/13	
P11	Zona do Caramulo	21/6/13	
P12	Mira (zona centro)	21/6/13	





## **2.2. Preparação dos extratos hidro alcoólicos**

Dada a sua complexa estrutura, o própolis não pode ser usado diretamente, pelo que deve ser extraído com um solvente apropriado, no caso do presente trabalho, utilizou-se para o referido efeito etanol puro.

Pesaram-se rigorosamente 10g de cada amostra em balança da marca Kern FKB d=0,1, de seguida dissolveram-se os mesmos em 100 ml de etanol a 70%, este procedimento foi realizado em triplicado.

As amostras foram extraídas durante 24h no escuro á temperatura ambiente sem agitação. Passado esse tempo, homogeneizaram-se as amostras em aparelho de ultrassons da marca Sonorex Rik 100 durante breves minutos e filtraram-se para separar alguns sólidos não dissolvidos e ceras.

O resíduo foi ressuspendido em etanol a 96% (Carlo Erba, com 96 a 96% de grau de pureza) e procedeu-se a uma nova filtração tendo-se combinado os filtrados com os extratos anteriormente obtidos para as mesmas amostras de própolis. Aferiu-se o volume a 250 mL utilizando etanol a 96%.A seguir encontram-se representadas algumas imagens de uma das amostras de própolis e a sua dissolução em etanol.

## **2.3 Fracionamento dos extratos brutos por extração liquido-liquido**

Colocou-se em tubo de centrífuga 5 ml de extrato bruto, extraiu-se 3 vezes com 1 mL de éter de petróleo da empresa Chem-lab ref: CL 001608.2500, com o intuito de retirar as ceras e os compostos apolares, de seguida homogeneizou-se em vórtex (Heidolf Reax),colocou-se em centrífuga (EBA 20 Hettich) durante 1 minuto a 3000 rpm.

Com pipeta Pasteur, transferiu-se cuidadosamente a maior parte do éter de petróleo para outro tubo e repetiram-se as outras 2 extrações e na última vez juntar a cada tubo, se necessário, uma espátula de sulfato de sódio anidro. Deixou-se em repouso, de um dia para o outro, no frio.

De seguida, adicionou-se 2 mL de acetato de etilo da Fisher Scientific (com o grau de pureza de 99,98%), com o objetivo de retirar a fração fenólica dos extratos brutos.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

E juntou-se também 4 mL de água destilada com o intuito de “provocar” uma separação de fases que não ocorreu com a adição do acetato de etilo.

Reservaram-se, de um dia para o outro no frio, pelo que seguidamente transferiram-se as frações de acetato de etilo para tubos de centrífuga e realizaram-se extrações sucessivas com 6 ml de acetato de etilo a todas as amostras, e 2 mL de H<sub>2</sub>O destilada com exceção das amostras P7 e P12 às quais foram adicionadas 3mL de H<sub>2</sub>O destilada, da P8 mais 4 mL de H<sub>2</sub>O,

Este processo também foi realizado em triplicado.

### 2.4. Medida de atividade antioxidante dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo

#### 2.4.1. Pesquisa de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Utilizou-se o método descrito por Tanja Petelinc e coautores (Tanja Petelinc et al., 2013) com algumas alterações.

A 0.2 ml de extrato bruto, solução padrão ou branco, juntaram-se 3 ml de H<sub>2</sub>O, mais 0.8 ml de reagente de Folin (Chem-Lab, Ref<sup>a</sup>1206040250), homogeneizou-se e adicionaram-se 1.2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 5% (m/v). Incubou-se a mistura reacional no escuro, à temperatura ambiente, durante cerca de 30 min e procedeu-se à leitura da absorvância ao comprimento de onda de 760 nm em espectrofotómetro de UV-VIS (Pharmacia LKB). Todas as determinações foram feitas em triplicado e utilizou-se como branco a solução de etanol a 70% (v/v). A quantificação foi efetuada mediante o traçado de uma reta de calibração utilizando soluções padrão de ácido gálico na gama de concentrações entre 31,25 mg/L a 500 mg/L. Os extratos brutos de própolis foram diluídos de 1:10 ou de 1:20 de forma a obter as absorvâncias respetivas na gama da reta de calibração.

Em relação às frações de acetato de etilo (onde se encontra a maior parte dos compostos fenólicos), seguiu-se o mesmo protocolo realizado para os extratos brutos com exceção da quantidade de amostra, que neste caso foram utilizadas 0,2 ml de cada fração, de branco ou de solução padrão, construiu-se uma reta de calibração com padrões de ácido gálico na mesma gama de concentrações, sem se recorrer a diluições e em triplicado.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

### 2.4.2 - Teste de DPPH dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo

Utilizou-se o método descrito por Tanja Petelinc e coautores (Tanja Petelinc et. al., 2013) com algumas alterações.

A 0,1 mL de extrato bruto, ou solução padrão ou metanol (branco), adicionaram-se 5 mL de solução de DPPH (60 mg/L) e incubou-se a mistura, no escuro, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, procedeu-se à leitura da absorvância das soluções ao comprimento de onda de 517 nm utilizando metanol como branco. Traçaram-se retas de calibração utilizando soluções de ácido gálico na gama de 500 mg/L a 31.25 mg/L, e expressou-se a atividade antiradicalar em equivalentes de ácido gálico. As determinações foram efetuadas em triplicado e os extractos brutos foram diluídos na razão de 1:100, de forma a situar a absorvância na gama das retas de calibração.

Em relação às frações de acetato de etilo obtidas, também se realizou este teste seguindo-se o mesmo protocolo que foi utilizado para os extratos brutos, com exceção da diluição das amostras, que neste caso foram diluídas na razão de 1:10, também se utilizou 0,1 mL de cada fração e também se teve como base uma curva de calibração na mesma gama de concentrações, tal como para os extratos brutos, e também se realizaram os ensaios em triplicado.

### 2.4.3. Teste de FRAP dos extratos brutos e das frações de acetato de etilo

Utilizou-se o método de Benzie e Strain, (Benzie e Strain, 1996) com algumas alterações. Para a realização deste teste utilizou-se 100 micrólitros de extrato, ou de branco ou solução padrão, adicionaram-se 3ml de reagente de FRAP, incubou-se em banho- maria a 37° durante 15 minutos e mediu-se a absorvância a 593nm em espectrofotómetro de marca Pharmacia LKB.

Realizaram-se os testes nas 12 amostras disponíveis em triplicado.

O reagente de FRAP, dada a sua rápida deterioração, é preparado na hora tendo em conta o número de determinações a realizar e é mantido em recipiente de plástico escuro. Para 80 determinações utilizaram-se 200 ml de solução de tampão acetato, mais



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

20 ml de solução de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) 10 mM, mais 20 ml de  $\text{FeCl}_3$  20 mM.

Para a preparação do tampão acetato 300 mM a pH 3.6, pesaram-se 3.1 g de acetato de sódio tri-hidratado e juntou-se mais 16 ml de ácido acético glacial perfazendo -se um volume de 1L com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada miliQ.

Para as soluções padrão de sulfato ferroso preparam-se soluções 1mM: 0.278g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  num litro de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada as diluições realizadas seguiram a seguinte série de padrões como se indica na tabela a seguir.

**Tabela 4 Representação da preparação da solução padrão utilizada no teste de FRAP**

Concentração do padrão	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solução	Água Destilada
mM	mL	mL
0.1	1	9
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	0

As diluições das amostras foram inicialmente de 1:20, mas como se verificaram leituras de absorvâncias muito altas, optou-se por realizar diluições de 1:100.

No caso do teste de medida de atividade antioxidante FRAP, para as frações de acetato de etilo também foi seguido o mesmo protocolo com algumas exceções.

Neste caso, todas as amostras foram diluídas na razão de 1:100, exceto a amostra nº 4, que foi diluída na razão de 1:10.

Também foi feita uma curva de calibração, utilizando-se como solução padrão  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na gama de concentrações 0,1 e 1 mM preparado de fresco, e as determinações feitas em triplicado.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

## 2.4. Preparação das amostras para análise em GC-MS

Do fracionamento dos extratos brutos com hexano e com acetato de etilo resultaram duas frações de cada amostra, que foram analisadas por GC-MS. As frações foram secas com sulfato de sódio anidro e injetadas sem qualquer passo de concentração.

As amostras foram analisadas num cromatógrafo Focus equipado com uma coluna DB5-MS (30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25  $\mu$ m), um injetor de repartição de fluxo e um sistema de injeção automático AS2000 (Thermomunicam), utilizando hélio como gás de arraste. Os compostos foram detetados num detetor de massa Polaris Q, entre 50 e 400 unidades de massa. O injetor foi programado a 270°C, a interface foi termostatizada a 290°C e a fonte iónica foi operada a 250°C. As amostras foram injetadas em duplicado utilizando um volume de injeção de 1  $\mu$ L.

A identificação tentativa dos componentes detetados foi efetuada por análise da fragmentação observada e por comparação com espectros das bibliotecas de espectros (NIST e WILEY) e com resultados da literatura.

A quantificação da quantidade de cada componente individual presente nas amostras analisadas foi efetuada com base na sua área cromatográfica relativa.



### Capítulo 3 – Resultados e Discussão

As amostras de própolis incluídas neste estudo foram recolhidas em apiários localizados em diferentes zonas de Portugal, num período de tempo que decorreu entre Abril de 2012 e Junho de 2013. A amostragem foi realizada essencialmente na Primavera (meses de Abril e de Junho) havendo duas amostras de outras estações do ano nomeadamente uma amostra recolhida em Agosto e outra em Fevereiro.

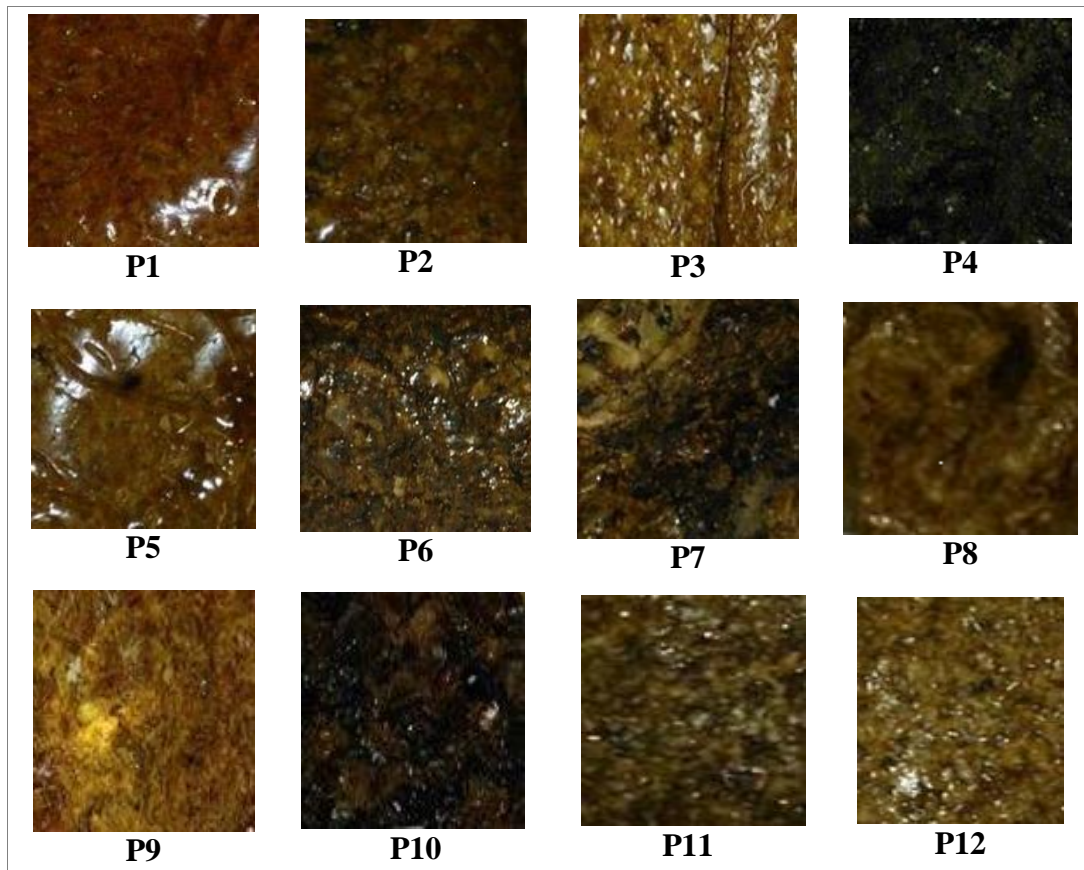
**Tabela 5 - Descrição da origem geográfica e das datas de recolha das várias amostras de propolis incluídas neste trabalho**

<b>Amostra</b>	<b>Origem Geográfica</b>	<b>Recolha</b>	<b>Observações</b>
<b>P1</b>	Mealhada/Buçaco	Abril 2013	Recolha em tela (Choupo)
<b>P2</b>	Vagos	Fevereiro 2013	Antes da Primavera (Sem choupo)
<b>P3</b>	Águeda	Abril 2013	
<b>P4</b>	Algarve	Abril 2012	
<b>P5</b>	Vagos	Abril 2013	Com choupo
<b>P6</b>	Montemor-o-Novo	Agosto 2012	Cardo Estrelado (com impurezas)
<b>P7</b>	Serra do Buçaco	16/6/12	Com choupo
<b>P8</b>	Lezíria do Ribatejo	16/6/12	
<b>P9</b>	Vale do Mondego	Junho 2012	Com choupo
<b>P10</b>	Vila Real I	21/6/13	
<b>P11</b>	Zona do Caramulo	21/6/13	
<b>P12</b>	Mira (zona centro)	21/6/13	

As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro e colocadas ao abrigo da luz até se proceder à sua análise.

O própolis em bruto apresentou diferentes cores (amarelo, laranja e castanho) bem como diferentes texturas e aparência (granuloso ou resinoso, heterogéneo ou homogéneo, baço ou brilhante). Estas diferenças visuais foram os primeiros indícios das

diferentes composições das amostras recolhidas e que são consequência de diferenças na flora existente em cada ponto de recolha (Figura 3.1).



**Ilustração 1 - Aspeto visual das amostras de própolis em bruto**

As amostras de própolis brutos foram sujeitas a extração com etanol a 70% (v/v), a frio, utilizando apenas os ultrassons como forma de dispersão da amostra de forma a solubilizar um máximo dos componentes do própolis e de forma a aplicar um método análogo ao utilizado pela maior parte dos apicultores.

Este passo de extração é fundamental pois o própolis é um material heterogéneo podendo conter areias, material vegetal insolúvel ou mesmo insetos ou partes de insetos. Por outro lado o própolis contém uma quantidade substancial de ceras que não sendo solúveis em soluções hidro-alcoólicas são eliminadas neste passo de extração.

Os resíduos da 1ª extração foram redissolvidos em etanol a 70% (v/v), para garantir uma dissolução mais completa de todos os componentes solúveis da amostra e os extratos foram combinados, aferidos ao mesmo volume e designados por extratos brutos.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Quando estes extratos foram colocados em frigorífico (cerca de 5°C) durante a noite observou-se a formação de precipitados que se assumiu serem essencialmente constituídos por ceras ou outros hidrocarbonetos procedendo-se a nova filtração do extrato para eliminar estes precipitados; após a 2ª filtração não se observou de novo de novo a formação de precipitados durante a refrigeração mas ainda assim, antes de qualquer manipulação as amostras foram sempre equilibradas com a temperatura ambiente e cuidadosamente homogeneizadas. Os extratos apresentaram um aspeto geralmente límpido (com exceção das amostras P1, P2, P3 e P5), e cores que oscilaram entre amarelo e laranja acastanhado (Figura 3.2).



**Ilustração 2 - Aspeto dos extratos hidroalcoólicos dos propolis**





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

O procedimento de extração foi realizado em duplicado e o rendimento de extração foi determinado por diferença entre o peso inicial de amostra e o peso de resíduo recolhido após as duas filtrações (Tabela 3.2).

O rendimento de extração oscilou entre 35,2% (m/m) (amostra P4, Algarve) e 91,6% (m/m), (amostra P9, Vale do Mondego) apresentando uma média de  $69,5 \pm 14,1$  % (m/m). Esta ampla gama de rendimentos de extração e o elevado desvio padrão da média dos rendimentos de extração mostram existir importantes diferenças de composição entre as amostras nomeadamente na presença de componentes solúveis em etanol. Por outro lado observa-se que a tonalidade do própolis (amarelo, laranja ou acastanhado), não está necessariamente associada a um maior rendimento de extração: por exemplo, as amostras P1 e P2 produziram extratos com uma aparência muito idêntica mas com diferentes rendimentos de extração e as amostras P6 e P7 apresentaram uma coloração laranja acastanhada que não correspondeu a um rendimento de extração superior a amostras de cor amarela.

A nível individual obtiveram-se médias dos rendimentos de extração com coeficientes de variação inferiores a 15% exceto no caso das amostras P4 (21,7 %), P7 (17,9 %), P10 (17,1 %) e P11 (23,8 %); estas diferenças mais importantes registadas sobretudo no caso das amostras P4 e P11 devem estar relacionadas com a presença de matérias heterogéneas que podem ser preferencialmente incluídos numa das alíquotas do duplicado. De notar que os resultados com maior dispersão foram obtidos para duas das amostras com menor rendimento de extração e que visualmente exibiam maior heterogeneidade. A análise de variância das médias dos rendimentos de extração confirmou existirem diferenças significativas entre amostras ( $p < 0,05$ ); efetuou-se a comparação de médias através do teste de Tukey e verificou-se que o rendimento de extração da amostra P4 (Algarve) foi significativamente inferior aos rendimentos de extração das amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P5 (Vagos II), P6 (Montemor-o-Novo), P8 (Lezíria do Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego); também a amostra P12 (Mira) apresentou um rendimento de extração significativamente inferior ao obtido para a amostra P9 (Vale do Mondego).



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 6 - Rendimentos brutos de extração das amostras de própolis com etanol**

Código	Mês	Origem geográfica	Rendimento de Extração (% m/m)				
			Valor individual	Valor individual	Média *	Desvio Padrão	CV (%)
P1	Abril	Mealhada/Buçaco	87.4	75.9	81.6 <sup>bc</sup>	8.1	9.9
P2	Fevereiro	Vagos I	67.7	69.7	68.7 <sup>abc</sup>	1.4	2.1
P3	Abril	Águeda	59.4	59.6	59.5 <sup>abc</sup>	0.1	0.2
P4	Abril	Algarve	35.2	48.0	41.6 <sup>a</sup>	9.0	21.7
P5	Abril	Vagos II	76.0	79.3	77.7 <sup>bc</sup>	2.3	3.0
P6	Agosto	Montemor-o-Novo	77.8	73.5	75.7 <sup>bc</sup>	3.1	4.1
P7	Junho	Serra do Buçaco	79.6	61.7	70.6 <sup>abc</sup>	12.6	17.9
P8	Junho	Ribatejo	75.9	78.4	77.2 <sup>bc</sup>	1.8	2.3
P9	Junho	Vale do Mondego	91.6	86.6	89.1 <sup>c</sup>	3.6	4.0
P10	Junho	Vila Real	75.3	59.0	67.2 <sup>abc</sup>	11.5	17.1
P11	Junho	Caramulo	86.0	61.2	73.6 <sup>abc</sup>	17.5	23.8
P12	Junho	Mira	48.9	55.3	52.1 <sup>ab</sup>	4.5	8.7

\* Médias referenciadas com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Observa-se assim de uma forma geral um rendimento de extração mais elevado para amostras provenientes da zona Centro de Portugal, e destacou-se o baixo rendimento registado para a amostra P4 (Algarve), o que parece indicar alguma escassez de espécies vegetais apropriadas à produção de própolis, nesta região do país.

Por outro lado o própolis produzido em regiões ricas em choupo apresentou, de uma forma geral, rendimentos de extração elevados (amostras P1, P5 e P9) o que confirma a ideia prevalecente no sector apícola sobre o contributo positivo desta espécie para a produtividade do própolis.

No entanto, a presença de choupo não deverá ser uma condição necessária e suficiente para a obtenção de um elevado rendimento de extração, como se pode observar no caso da amostra P7 (Serra do Buçaco) para a qual também é referida a presença de choupo e que no entanto apresenta um rendimento de extração inferior ao das amostras P5, P9 e P1. Também no caso das amostras P2 e P5, ambas provenientes do mesmo apiário (Vagos) mas em diferentes alturas do ano (Fevereiro e Abril), observou-se que a presença de choupo (referenciada apenas para a amostra recolhida em Abril), está



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

associada a um aumento do rendimento de extração mas não o suficiente para se registarem diferenças significativas entre estas amostras.

Os extratos brutos foram caracterizados através da reação de Folin-Ciocalteu (determinação do teor em compostos fenólicos totais) e quanto à sua atividade antioxidante avaliada mediante dois testes específicos: a atividade de sequestração do radical DPPH e a atividade antioxidante de redução férrica (FRAP).

As médias dos teores de compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos, do própolis bruto e do extrato seco são apresentadas Tabela 3.3, expressas em equivalentes de ácido gálico.

**Tabela 7 - teores de compostos fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos, no própolis bruto e no extrato seco, expresso em equivalentes de ácido gálico**

Código	Mês	Origem geográfica	Teor de compostos fenólicos totais					
			Solução hidroalcoólica (mg/mL)		Própolis bruto (mg/g)		Extracto seco (mg/g)	
			Média*	Desvio Padrão	Média*	Desvio Padrão	Média*	Desvio Padrão
P1	Abril	Mealhada/Buçaco	5.7 <sup>f</sup>	0.03	141.5 <sup>f</sup>	0.83	173.4 <sup>h</sup>	1.0
P2	Fevereiro	Vagos I	3.6 <sup>cd</sup>	0.11	90.7 <sup>cd</sup>	2.66	132.0 <sup>cde</sup>	3.9
P3	Abril	Águeda	2.8 <sup>b</sup>	0.20	70.0 <sup>b</sup>	4.96	117.6 <sup>b</sup>	8.3
P4	Abril	Algarve	0.9 <sup>a</sup>	0.01	22.8 <sup>a</sup>	0.36	54.8 <sup>a</sup>	0.9
P5	Abril	Vagos II	3.9 <sup>cd</sup>	0.13	96.9 <sup>cd</sup>	3.36	124.8 <sup>bcd</sup>	4.3
P6	Agosto	Montemor-o-Novo	4.0 <sup>d</sup>	0.15	100.2 <sup>d</sup>	3.66	132.4 <sup>cde</sup>	4.8
P7	Junho	Serra do Buçaco	3.8 <sup>cd</sup>	0.03	94.8 <sup>cd</sup>	0.70	134.2 <sup>cde</sup>	1.0
P8	Junho	Ribatejo	4.7 <sup>e</sup>	0.12	117.4 <sup>e</sup>	3.12	152.1 <sup>fg</sup>	4.0
P9	Junho	Vale do Mondego	5.5 <sup>f</sup>	0.09	137.2 <sup>f</sup>	2.30	154.0 <sup>g</sup>	2.6
P10	Junho	Vila Real	3.6 <sup>cd</sup>	0.15	90.8 <sup>cd</sup>	3.80	135.1 <sup>de</sup>	5.7
P11	Junho	Caramulo	3.5 <sup>c</sup>	0.28	88.6 <sup>c</sup>	7.10	120.4 <sup>bc</sup>	9.6
P12	Junho	Mira	2.9 <sup>b</sup>	0.12	72.5 <sup>b</sup>	3.05	139.2 <sup>ef</sup>	5.8

\*Médias referenciadas com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0,05)

Os valores do teor de compostos fenólicos totais da solução hidroalcoólica e do própolis bruto são proporcionais pelo que o seu cálculo visa apenas expressar esta variável em unidades de massa da matriz própolis. Já no caso da quantidade de compostos fenólicos do extrato seco, esta variável combina o rendimento de extração com o teor de



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

compostos fenólicos da solução hidroalcoólica portanto avalia a qualidade antioxidante do extrato independentemente da sua quantidade.

O teor de compostos fenólicos do própolis bruto oscilou entre 0,9 e 5,7 mg/mL de solução hidroalcoólica e apresentou uma média de  $3,7 \pm 1,3$  mg/mL, para o conjunto das amostras analisadas.

O coeficiente de variação das determinações dos teores de compostos fenólicos individuais variou entre 0,6% e 8,0%, denotando homogeneidade entre os triplicados das determinações; no conjunto das amostras o coeficiente de variação foi de 35,4% o que indica haver grandes variações neste parâmetro de amostra para amostra.

As amostras de própolis P1 (Mealhada/Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego) apresentaram teores de compostos fenólicos significativamente superiores a todas as outras amostras enquanto as amostras de própolis P4 (Algarve), P3 (Águeda) e P12 (Mira) apresentaram teores de compostos fenólicos significativamente inferiores a todas as outras amostras.

O teor de compostos fenólicos do extrato seco foi também significativamente superior no caso das amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego) o que indica que estas amostras combinam um rendimento de extração elevado e um teor de compostos fenólicos elevado por unidade de massa de extrato.

As amostras de própolis P4 (Algarve) e P3 (Águeda) apresentaram teores de compostos fenólicos no extrato seco significativamente inferiores a todas as outras amostras mas o mesmo não se verificou com a amostra P12 (Mira): a amostra P12 apresenta um rendimento de extração baixo mas o extrato é rico em compostos fenólicos pelo que o teor de compostos fenólicos por unidade de massa de extrato seco da amostra P12 é significativamente superior ao das amostras P3, P4 e P11.

As médias dos valores encontrados para a atividade de sequestração do radical DPPH dos extratos hidroalcoólicos, do própolis bruto e do extrato seco são apresentadas Tabela 3.4, expressas em equivalentes de ácido gálico.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 8 - Atividade de sequestração do radical DPPH dos extratos hidroalcoólicos, do extrato bruto e do extrato seco, expressa em equivalentes de ácido gálico**

Código	Mês	Origem geográfica	Sequestração do radical DPPH					
			Solução hidroalcoólica (mg/mL)		Própolis bruto (mg/g)		Extrato seco (mg/g)	
			Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão
P1	Abril	Mealhada/Buçaco	3.2 <sup>f</sup>	0.2	79.5 <sup>f</sup>	4.3	97.4 <sup>f</sup>	5.2
P2	Fevereiro	Vagos I	1.8 <sup>cd</sup>	0.0	45.9 <sup>cd</sup>	0.6	66.8 <sup>cd</sup>	0.9
P3	Abril	Águeda	1.4 <sup>b</sup>	0.0	34.2 <sup>b</sup>	0.7	57.5 <sup>bc</sup>	1.1
P4	Abril	Algarve	0.5 <sup>a</sup>	0.0	12.7 <sup>a</sup>	0.9	30.6 <sup>a</sup>	2.3
P5	Abril	Vagos II	1.5 <sup>bc</sup>	0.0	38.4 <sup>bc</sup>	0.8	49.4 <sup>b</sup>	1.0
P6	Agosto	Montemor-o-Novo	2.2 <sup>de</sup>	0.1	54.2 <sup>de</sup>	2.5	71.6 <sup>d</sup>	3.3
P7	Junho	Serra do Buçaco	2.2 <sup>de</sup>	0.0	54.6 <sup>de</sup>	0.8	77.2 <sup>de</sup>	1.1
P8	Junho	Ribatejo	2.0 <sup>de</sup>	0.2	50.8 <sup>de</sup>	4.2	65.8 <sup>cd</sup>	5.5
P9	Junho	Vale do Mondego	3.4 <sup>f</sup>	0.1	84.0 <sup>f</sup>	2.6 <sup>f</sup>	94.2 <sup>f</sup>	2.9
P10	Junho	Vila Real	2.3 <sup>e</sup>	0.2	57.7 <sup>e</sup>	5.3	85.9 <sup>ef</sup>	7.9
P11	Junho	Caramulo	0.7 <sup>a</sup>	0.2	16.7 <sup>a</sup>	5.3	22.6 <sup>a</sup>	7.2
P12	Junho	Mira	1.4 <sup>b</sup>	0.1	34.6 <sup>b</sup>	1.6	66.5 <sup>cd</sup>	3.1

\*Médias referenciadas com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0,05)

A atividade de sequestração do radical DPPH dos extratos hidroalcoólicos foi equivalente à de soluções de ácido gálico com concentrações entre 0,47 e 3,46 mg/mL, sendo a média das várias amostras de  $1,9 \pm 0,9$  mg/mL.

As amostras de própolis P1 (Mealhada/Buçaco), P9 (Vale do Mondego) e P10 (Vila Real) apresentaram capacidades de sequestração do radical DPPH significativamente superiores a todas as outras enquanto as amostras P4 (Algarve) e P3 (Águeda) e P12 (Mira) apresentaram uma capacidade de sequestração do radical DPPH significativamente inferior a todas as outras amostras tal como se verificou para o teor de compostos fenólicos. A amostra do Ribatejo (P8), que teve um teor de compostos fenólicos superior a todas as outras exceto as amostras P1 e P9, apresenta agora uma capacidade antiradicalar comparável às amostras P6 (Montemor-o-Novo) e P7 (Serra do Buçaco). A amostra P10 que não tinha revelado um teor particularmente elevado de compostos fenólicos destaca-se a nível da atividade antiradicalar. Estas observações são



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

indícios de que a atividade antiradicalar de diferentes compostos fenólicos pode não ser equivalente e que algumas amostras de própolis poderão conter componentes não fenólicos que lhes conferem atividade antiradicalar.

A atividade antioxidante dos extractos brutos foi ainda determinado através da reação de avaliação da capacidade antioxidante de redução férrica que mede a capacidade de doação de eletrões por parte das espécies antioxidantes. Os resultados apresentam-se na Tabela 3.5, expressos em equivalentes de sulfato ferroso, tendo-se efetuado como anteriormente o cálculo deste parâmetro relativamente ao própolis bruto e ao extrato seco.

Registaram-se valores de atividade antioxidante de redução férrica entre 24,5 e 101,2 mM (equivalentes de  $\text{FeSO}_4$ ) com uma média de  $69,5 \pm 19,0$  mM.

**Tabela 9 - Atividade antioxidante de redução férrica dos extratos hidroalcoólicos, do própolis bruto e do extrato seco, expresso em equivalentes de sulfato ferroso.**

Código	Mês	Origem geográfica	Atividade antioxidante de redução férrica (FRAP)					
			Solução hidroalcoólica (mM)		Própolis bruto (milimoles/g)		Extrato seco (milimoles/g)	
			Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão
P1	Abril	Mealhada/Buçaco	81.8 <sup>de</sup>	1.0	2.05 <sup>de</sup>	0.03	2.51 <sup>c</sup>	0.03
P2	Fevereiro	Vagos I	68.1 <sup>c</sup>	0.1	1.70 <sup>c</sup>	0.00	2.48 <sup>c</sup>	0.00
P3	Abril	Águeda	55.0 <sup>b</sup>	0.4	1.38 <sup>b</sup>	0.01	2.31 <sup>c</sup>	0.02
P4	Abril	Algarve	24.6 <sup>a</sup>	0.2	0.62 <sup>a</sup>	0.00	1.48 <sup>a</sup>	0.01
P5	Abril	Vagos II	57.6 <sup>b</sup>	5.4	1.44 <sup>b</sup>	0.13	1.86 <sup>b</sup>	0.17
P6	Agosto	Montemor-o-Novo	79.3 <sup>de</sup>	3.3	1.98 <sup>de</sup>	0.08	2.62 <sup>c</sup>	0.11
P7	Junho	Serra do Buçaco	98.4 <sup>f</sup>	4.1	2.46 <sup>f</sup>	0.10	3.48 <sup>d</sup>	0.14
P8	Junho	Ribatejo	75.0 <sup>cd</sup>	0.8	1.87 <sup>cd</sup>	0.02	2.43 <sup>c</sup>	0.03
P9	Junho	Vale do Mondego	81.7 <sup>de</sup>	1.5	2.04 <sup>de</sup>	0.04	2.29 <sup>c</sup>	0.04
P10	Junho	Vila Real	87.3 <sup>e</sup>	6.6	2.18 <sup>e</sup>	0.16	3.25 <sup>d</sup>	0.24
P11	Junho	Caramulo	55.7 <sup>b</sup>	4.1	1.39 <sup>b</sup>	0.10	1.89 <sup>b</sup>	0.14
P12	Junho	Mira	69.7 <sup>c</sup>	1.1	1.74 <sup>c</sup>	0.03	3.35 <sup>d</sup>	0.05

\*Médias referenciadas com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

As amostras com atividade de redução férrica significativamente superior a todas as outras foram as amostras P7 (Serra do Buçaco) e P10 (Vila Real), sendo que esta última



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

já se tinha destacado a nível da atividade antiradicalar. Quanto ao teor de compostos fenólicos tanto a amostra P7 com a amostra P10 não se situaram entre as amostras com maiores concentrações destes compostos o que indica tal como observado para o DPPH que apesar de poder haver uma correlação entre as três atividades medidas as amostras individuais apresentam diferenças que estarão certamente relacionadas com a sua composição específica e pode mesmo depender da presença e concentração de alguns componentes individuais.

Também aqui não se verifica uma relação direta entre a presença de choupo e a atividade de redução férrica do extrato uma vez que a amostra P2 (Vagos I, sem choupo) até apresenta uma atividade de redução férrica superior à atividade registada para a amostra P5 (Vagos II, com choupo); por outro lado para a amostra P9 (Vila Real) não foi indicada a presença de choupo na zona do apiário, mas o valor de atividade antioxidante de redução férrica é superior aos das amostras P1, P9 e P5 para as quais foi indicada a presença desta espécie vegetal. Assim conclui-se que o choupo pode contribuir para a qualidade do própolis mas não é a única espécie vegetal com essa característica. A qualidade final do própolis e as suas propriedades antioxidantes dependem da natureza de todas as espécies disponíveis na zona do apiário, que produzem resinas ou óleos suscetíveis de utilização pelas abelhas na fabricação de própolis.

Procurou-se testar a ocorrência de correlações entre as várias variáveis estimadas para este conjunto de amostras através da determinação do coeficiente de correlação de Pearson.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 10 - Coeficientes de correlação de Pearson das diferentes atividades avaliadas na solução de própolis, no própolis bruto e no extrato seco.**

			Coeficiente de correlação de Pearson								
			Folin			DPPH			FRAP		
			Solução	Própolis	Extrato	Solução	Própolis	Extrato	Solução	Própolis	Extrato
Folin	Solução	Valor	1	<b>1,000**</b>	<b>0,920**</b>	<b>0,856**</b>	<b>0,856**</b>	<b>0,702*</b>	<b>0,723**</b>	<b>0,723**</b>	0,231
		Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,008	0,008	0,470
	Própolis	Valor		1	<b>0,920**</b>	<b>0,856**</b>	<b>0,856**</b>	<b>0,702*</b>	<b>0,723**</b>	<b>0,723**</b>	0,231
		Sig. (2-tailed)			0,000	0,000	0,000	0,011	0,008	0,008	0,470
	Extrato	Valor			1	<b>0,799**</b>	<b>0,799**</b>	<b>0,757**</b>	<b>0,808**</b>	<b>0,808**</b>	0,506
		Sig. (2-tailed)				0,002	0,002	0,004	0,001	0,001	0,093
DPPH	Solução	Valor				1	<b>1,000**</b>	<b>0,946**</b>	<b>0,779**</b>	<b>0,779**</b>	0,406
		Sig. (2-tailed)					0,000	0,000	0,003	0,003	0,190
	Própolis	Valor					1	<b>0,946**</b>	<b>0,779**</b>	<b>0,779**</b>	0,406
		Sig. (2-tailed)						0,000	0,003	0,003	0,190
	Extrato	Valor						1	<b>0,810**</b>	<b>0,810**</b>	<b>0,617*</b>
		Sig. (2-tailed)							0,001	0,001	0,032
FRAP	Solução	Valor							1	<b>1,000**</b>	<b>0,798**</b>
		Sig. (2-tailed)								0,000	0,002
	Própolis	Valor								1	<b>0,798**</b>
		Sig. (2-tailed)									0,002
	Extrato	Valor									1
		Sig. (2-tailed)									

\*A correlação é significativa ao nível 0,05; \*\* A correlação é significativa ao nível 0,01





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Quando o coeficiente de correlação de Pearson se situa entre 0,9 e 1,0 as variáveis consideram-se muito fortemente correlacionadas; quando se situa entre 0,6 e 0,9 consideram-se fortemente correlacionadas (Callegari-Jacques et al., 2003).

A correlação entre os valores das variáveis medidas nas soluções hidroalcoólicas e no própolis bruto estão perfeitamente correlacionadas pois os valores do própolis foram calculados a partir das soluções através de fatores de conversão relacionados com a massa de própolis e o volume da solução hidroalcoólica. Já no caso do extrato seco, combina-se informação relativa às propriedades do extracto e do rendimento de extração, para obter um valor de atividade relativo ao extracto seco. Se um própolis contiver uma pequena quantidade de compostos extratáveis mas esses compostos apresentarem grande atividade antioxidante essa amostra pode ser melhor classificada quanto à atividade antioxidante do extracto seco do que quanto à atividade do própolis bruto ou da solução hidroalcoólica. Observou-se essa tendência no caso da amostra P12 (Mira), cujo extracto seco se posicionou num lugar mais destacado no conjunto das amostras do que a correspondente solução hidroalcoólica e o próprio própolis bruto, sendo que a média do rendimento de extração desta amostra foi uma das mais baixas (52,1% m/m). Pelo contrário quando além dos compostos com atividade nestes testes o própolis contém outros compostos que são co extraídos, o extracto seco apresentará uma maior massa devido ao contributo de componentes não ativos pelo que será classificado comparativamente às outras amostras de forma menos favorável do que a correspondente solução hidroalcoólica e o própolis bruto. Parece ser o caso das amostras P5 (Vagos II) ou P6 (Montemor-o-Novo) e P8 (Ribatejo) que apresentaram rendimentos de extração superiores a 70% (m/m) mas para as quais se verificaram classificações das atividades dos extratos secos relativamente mais baixas que as das correspondentes soluções hidroalcoólicas.

Apesar destas ligeiras diferenças os valores obtidos para as variáveis testadas nas soluções hidroalcoólicas estão fortemente correlacionados com os valores obtidos para as mesmas variáveis nos correspondentes própolis brutos e extratos secos, tendo-se obtido coeficientes de correlação de Pearson sempre superiores a 0,6.

Também quando se compararam os valores obtidos nos três testes efetuados, para as mesmas amostras e as mesmas matrizes, obtiveram-se coeficientes de correlação de



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Pearson superiores a 0,6 o que indica que o teor de compostos fenólicos de cada amostra está fortemente correlacionado com a atividade de sequestração de DPPH e com a atividade de redução férrica dessa mesma amostra. A mesma correlação forte foi observada entre a atividade de sequestração do DPPH e a atividade de redução férrica.

A correlação destas variáveis com o rendimento de extração é muito forte no caso do teor de compostos fenólicos totais ( $\rho = 0,936$ ), e forte no caso da reação de sequestração do DPPH ( $\rho = 0,730$ ) e da atividade de redução férrica ( $\rho = 0,615$ ), estando esta última próxima do limite a partir do qual se considera uma correlação moderada ( $\rho = 0,6$ ).

Por outras palavras estes resultados indicam que os extratos do própolis apresentam uma quantidade significativa de compostos fenólicos cuja concentração está fortemente correlacionada com o rendimento de extração e que muitos destes compostos apresentam atividades significativas quer da atividade de sequestração do radical DPPH quer de redução férrica. No entanto as variações nas atividades antioxidantes dos componentes fenólicos individuais e a co-extração de outros componentes com menor atividade antioxidante resultam numa correlação mais fraca entre o rendimento de extração e as atividades antioxidantes individuais.

Os extratos hidroalcoólicos brutos foram fracionados com hexano e com acetato de etilo de forma a separar hidrocarbonetos e compostos fenólicos, respetivamente. Na fração extraída com hexano devem concentrar-se os componentes terpénicos do própolis provenientes dos materiais resinosos que as abelhas utilizam na fabricação deste produto. A fração terpénica além de poder dar informação relativa à origem botânica do própolis é frequentemente correlacionada com a atividade antimicrobiana deste produto pois esta bioatividade também tem sido encontrada nos terpenos individuais.

A fração de acetato de etilo concentra os componentes fenólicos do própolis que lhe conferem as suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti mutagénica. Uma vez que partimos de uma solução hidroalcoólica concentrada houve que adicionar alguma água para promover a separação de fases sobretudo no caso do acetato de etilo pelo que no final obteve-se também uma fase aquosa onde podem encontrar-se alguns componentes muito polares do própolis nomeadamente os compostos de natureza proteica provenientes dos sucos digestivos das abelhas.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Neste trabalho foi efetuada a caracterização funcional e química das frações de acetato de etilo onde é expectável que se concentrem a maior parte dos componentes funcionais. As frações de hexano foram apenas analisadas por GC-MS uma vez que o seu reduzido volume após a secagem com sulfato de sódio anidro não permitiu a realização dos restantes testes. Ainda assim a análise dos extratos de hexano por GC-MS permitiu avaliar pelo menos do ponto de vista qualitativo os seus componentes.

O fracionamento com solventes, além de dar origem a frações com menos componentes e portanto simplificar a separação analítica, permitiu também eliminar a água presente nas soluções hidroalcoólicas sem envolver nenhum passo de aquecimento ou evaporação sob vácuo que poderiam afetar a composição tanto da fração terpénica (hexano) quer da fração fenólica (acetato de etilo). O volume final das frações de acetato de etilo foi cerca de 8 mL e não foi efetuada qualquer concentração pois pretendeu-se manter o mais possível a integridade da amostra e os testes de atividade antioxidante revelaram que as amostras fracionadas estavam suficientemente concentradas para poderem ser analisadas por GC-MS.

Na Tabela 3.7 apresentam-se os resultados da caracterização funcional das frações de acetato de etilo (teor de compostos fenólicos, atividade de sequestração do DPPH e atividade de redução férrica).

Os teores de fenólicos totais das frações de acetato de etilo variaram entre 99,57 mg/L (amostra P4, Algarve) e 596,52 mg/L (amostra P10, Vila Real) apresentando uma média de  $440,9 \pm 153,8$  mg/L. Estes valores foram substancialmente inferiores aos registados para os extratos brutos pois no processo de extração ocorreu uma diluição de quase 1:2 uma vez que o volume inicial de extracto bruto foi de 5 mL e o volume final dos extratos de acetato de etilo foi cerca de 8 mL.

As amostras P1 (Mealhada/Buçaco) e P8 (Ribatejo) apresentaram tal como a amostra P10, teores de compostos fenólicos totais significativamente superiores a todas as outras amostras. Por outro lado, e tal como nos extratos brutos, os extratos de acetato de etilo das amostras P4 (Algarve) e P3 (Águeda) apresentaram teores de compostos fenólicos significativamente inferiores a todas as outras.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 11 - Teor de compostos fenólicos atividade de sequestração de DPPH e atividade antioxidante de redução férrica das frações de acetato de etilo obtidas a partir dos extratos hidroalcoolicos**

Código	Mês	Origem geográfica	Atividade antioxidante das frações de acetato de etilo avaliada por:					
			Teor de compostos fenólicos totais <sup>1</sup> (mg/L)		Sequestração do radical DPPH <sup>1</sup> (mg/L)		Atividade antioxidante de redução férrica <sup>2</sup> (mM)	
			Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão	Média *	Desvio Padrão
P1	Abril	Mealhada/Buçaco	572.6 <sup>fg</sup>	6.8	1848.3 <sup>g</sup>	136.6	76.5 <sup>f</sup>	3.4
P2	Fevereiro	Vagos I	495.9 <sup>d</sup>	3.4	778.9 <sup>c</sup>	8.6	60.4 <sup>de</sup>	1.4
P3	Abril	Águeda	252.8 <sup>b</sup>	19.4	503.4 <sup>b</sup>	9.6	45.8 <sup>bc</sup>	2.7
P4	Abril	Algarve	102.8 <sup>a</sup>	4.6	14.0 <sup>a</sup>	10.1	3.5 <sup>a</sup>	0.2
P5	Abril	Vagos II	507.8 <sup>de</sup>	6.1	872.5 <sup>cd</sup>	26.8	54.8 <sup>cd</sup>	6.4
P6	Agosto	Montemor-o-Novo	488.3 <sup>d</sup>	12.3	1255.0 <sup>ef</sup>	201.5	65.7 <sup>c</sup>	1.9
P7	Junho	Serra do Buçaco	547.0 <sup>efg</sup>	3.1	1074.4 <sup>de</sup>	42.5	64.4 <sup>de</sup>	0.8
P8	Junho	Ribatejo	577.4 <sup>fg</sup>	3.1	1587.5 <sup>g</sup>	20.3	80.1 <sup>f</sup>	4.8
P9	Junho	Vale do Mondego	537.2 <sup>ef</sup>	2.2	2025.7 <sup>g</sup>	17.0	81.6 <sup>f</sup>	4.5
P10	Junho	Vila Real	587.0 <sup>g</sup>	13.5	1465.8 <sup>fg</sup>	9.8	59.4 <sup>de</sup>	2.2
P11	Junho	Caramulo	296.7 <sup>c</sup>	0.9	349.3 <sup>b</sup>	14.1	39.1 <sup>b</sup>	1.8
P12	Junho	Mira	324.8 <sup>c</sup>	20.9	529.8 <sup>b</sup>	0.03	44.5 <sup>b</sup>	4.3

\*Médias referenciadas com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0,05)

<sup>1</sup>Expressos em equivalentes de ácido gálico

<sup>2</sup>Expressos em equivalentes de sulfato ferroso

Os valores de atividade de sequestração do radical DPPH oscilaram entre 1848.3 mg/L e 14,0 mg/L com uma média de  $1025.4 \pm 611.9$  mg/L. Os extratos de acetato de etilo com maior atividade antiradicalar relativamente ao DPPH foram os correspondentes às amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego) e os extratos de menor atividade corresponderam às amostras P4 (Algarve), P3 (Águeda), P11 (Caramulo) e P12 (Mira). Estes resultados são idênticos aos obtidos para os extratos brutos no caso das amostras P1, P9, P4, P3 e P12.

Os valores de atividade de redução férrica situaram-se na gama de 3,5 mg/L a 81,6 mg/L apresentando uma média de  $56.3 \pm 21.1$  mg/L. Os extratos de acetato de etilo com maior atividade de redução férrica foram também os correspondentes às amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego), tal como se verificou para



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

a atividade de sequestração do DPPH. Os extratos de menor atividade de redução férrica corresponderam às amostras P4 (Algarve), P11 (Caramulo) e P12 (Mira).

Testou-se a existência de correlações entre as propriedades avaliadas para as frações de acetato de etilo e entre estas e as mesmas propriedades medidas para os extratos brutos; foram encontradas correlações fortes ou muito fortes entre todas as combinações de variáveis testadas. Estes resultados indicam que os compostos bioativos dos extratos brutos são extraídos de forma proporcional pelo acetato de etilo.

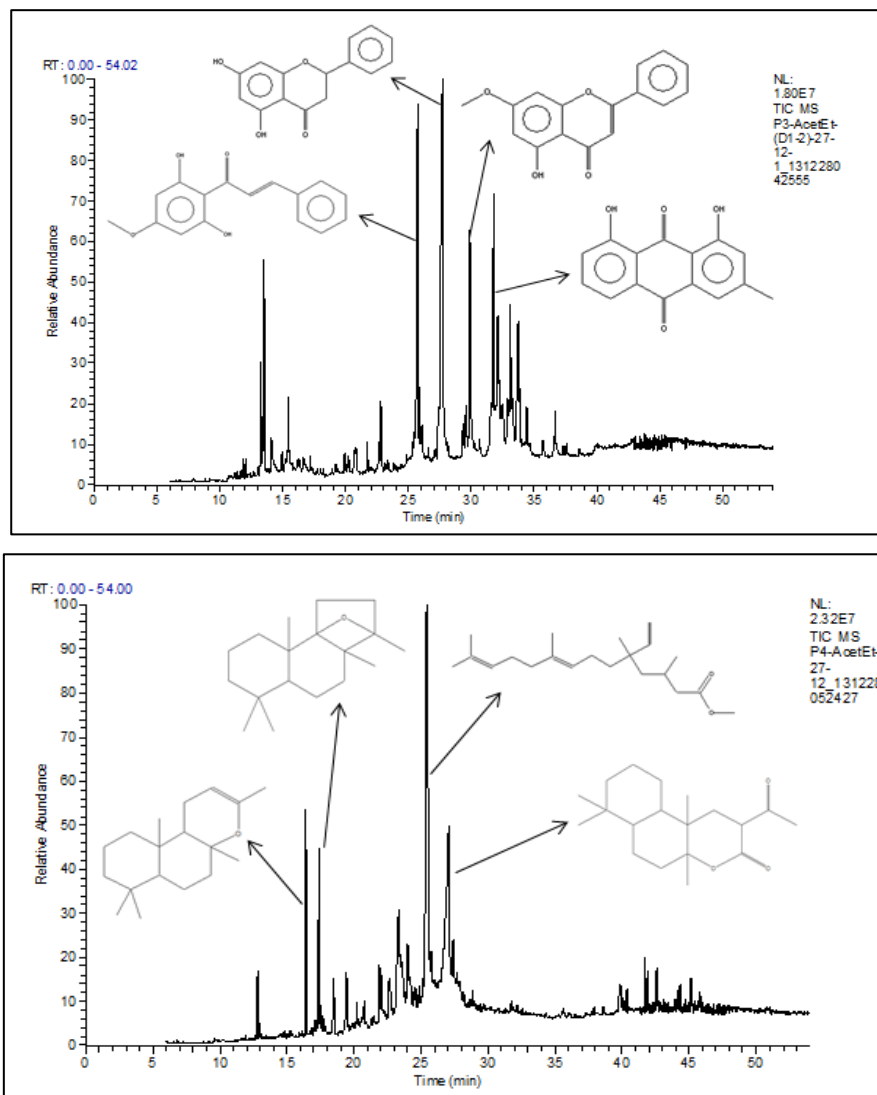
Assim considerou-se que os extratos de acetato de etilo se podem considerar representativos da atividade biológica do própolis e efetuou-se a sua análise por GC-MS de forma a identificar alguns dos compostos bioativos neles existentes, e tentar encontrar correlações entre a sua concentração no extracto e a atividade antioxidante previamente estimada.

Para todas as amostras exceto a amostra P4 (Algarve), encontraram-se perfis idênticos de cromatogramas de corrente iónica total e os espectros de massa indicam que as amostras são constituídas maioritariamente pelos compostos, registando-se diferenças a nível da sua concentração absoluta e relativa (Figura 3.3). A amostra P4 (Algarve), além de apresentar um perfil completamente distinto, parece ser composta essencialmente por compostos terpénicos o que justifica o facto de os resultados de atividade funcional obtidos para esta amostra serem tão diferentes dos obtidos com as restantes.

A amostra P3 (Águeda) apesar de ter apresentado valores modestos para as atividades antioxidantes testadas por comparação com as restantes amostras (exceto a P4), apresenta na sua composição compostos fenólicos análogos aos encontrados nas restantes amostras apenas em concentrações mais reduzidas.

Por este motivo o tratamento quantitativo dos dados cromatográficos foi prosseguido para o conjunto das amostras exceto para a amostra P4 pois não contendo os mesmos componentes principais não foi possível comparar as suas concentrações relativas com as restantes amostras.

## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica



**Ilustração 3 - Perfis cromatográficos dos P3 E P4**

Foi tentada a derivatização dos extratos de acetato de etilo com um agente sililante de grupos hidroxilo de forma a minimizar a interação destes grupos com a coluna e melhorar a separação cromatográfica. No entanto verificou-se que este processo conduziu a uma degradação significativa da amostra com desaparecimento de picos significativos e ocorrência de uma grande quantidade de interferentes. Dado que a reação de derivatização requer algum aquecimento da amostra considerou-se que essa operação conduziu às alterações verificadas pelo que se prosseguiu a análise cromatográfica dos extratos em natureza.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

A identificação tentativa dos principais componentes dos extratos de acetato de etilo foi efetuada tendo em conta o tempo de retenção do composto, o respetivo espectro de massa e a comparação destes resultados com espectros de massa das bibliotecas NIST e WILEY, bem como comparação com a informação disponível na literatura. De referir que, mesmo quando se verificou existir uma semelhança muito grande entre os espectros dos compostos e os espectros das bibliotecas utilizadas, a identificação apresentada carece de confirmação com um padrão autêntico, pelo que é sempre considerada uma identificação tentativa.

De todos os compostos presentes no perfil cromatográfico selecionaram-se 18 componentes que estavam presentes em concentrações mais elevadas pelo que se obtiveram espectros de massa com qualidade suficiente para ser efetuada a respetiva análise comparativa. Os compostos tentativamente identificados nos perfis cromatográficos das frações de acetato de etilo de todas as amostras de própolis, exceto a amostra P4, são apresentados na Tabela 3.8.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 12 - Compostos tentativamente identificados nas frações de acetato de etilo correspondentes aos própolis P1 a P12 com exceção da amostra P4**

Pico nº	Janela de Retenção (min)	Nome do composto	Peso molecular	Grupo funcional
1	13,24-13,26	δ-selineno	204	Sesquiterpeno
2	13,49-13,52	β-Eudesmol	222	Álcool terpénico
3	14,08-14,20	3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno-[1,2b]-furan-2-ona	174	Cetona aromática
4	15,43-15,5	Rosifoliol	222	Álcool terpénico
5	16,63-16,78	Ácido 3,4-dimetoxicinâmico	208	Ácido hidroxicinâmico
6	21,73-21,77	Ácido 3,4-metilenodioxicinâmico	192	Ácido hidroxicinâmico
7	22,81-22,85	Ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico	236	Ácido hidroxicinâmico
8	25,69-25,75	2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona	270	Derivado fenólico (chalcona)
9	25,88-25,92	3-fenil-2-propenoato de 3-fenil-2-propenilo (Cinamilcinamato)	264	Éster de ácido cinâmico
10	27,42-27,60	5,7-dihidroxi-dihidroflavanona (Dihidrocrisina)	256	Derivado fenólico (flavanona)
11	29,57-29,66	1-etoxi-3-metoxi-10-metil-9-acridanona	284	Cetona
12	29,88-30,01	5-hidroxi-7-metoxi-flavona (Tetocrisina)	268	Derivado fenólico (flavona)
13	31,62-31,87	5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (Crisina)	254	Derivado fenólico (flavona)
14	32,13-32,31	1,8-dihidroxi-3-metil-9,10-antracenodiona (Crisofanol)	254	Derivado fenólico (cetona)
15	33,07-33,28	3,5,7-Trihidroxiflavona (Galangina)	270	Derivado fenólico (flavona)
16	33,67-33,81	Derivado da crisina	272	Derivado fenólico (flavona)
17	34,40-34,54	Derivado da crisina	272	Derivado fenólico (flavona)
18	36,66-36,76	Derivado da crisina	272	Derivado fenólico (flavona)





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Verificou-se que os compostos predominantes nas amostras analisadas são ácidos hidroxicinâmicos e hidroxiflavonas em particular isómeros e derivados da crisina, tendo-se também encontrado sesquiterpenos, álcoois terpénicos, cetonas e ésteres. Na parte final do cromatograma surgem alguns derivados da crisina que pelo tempo de retenção e dimensão do pico poderão ser derivados glicosilados cuja detecção por GC-MS se encontra limitada pela baixa volatilidade.

Estes resultados estão de acordo com a elevada atividade antioxidante encontrada nestes extratos pois os ácidos hidroxicinâmicos e as hidroxiflavonas são famílias de compostos conhecidos pela sua elevada capacidade antiradicalar e redutora encontrando-se na literatura numerosas referências às suas atividades individuais.

Razzaghi-Asl e coautores (Razzaghi-Asl et al., 2003) apresentaram uma revisão dos trabalhos publicados sobre a atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos e a relação entre esta atividade e a estrutura molecular; a presença do grupo catecol e a presença da ligação dupla do ácido cinâmico são duas características consideradas fundamentais para a atividade funcional destes compostos.

Marcucci e coautores (Marcucci et al. 2001) identificaram a presença dos ácidos 3-prenil-4-hidroxicinâmico e 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico em amostras de própolis brasileiro e demonstraram o efeito antibacteriano destes compostos.

Além de propriedades antioxidantes e antimicrobianas os ácidos hidroxicinâmicos têm sido referenciados como compostos com atividade antimutagénica e antiproliferativa o que evidencia o seu potencial uso terapêutico (Rocha et al., 2012).

Além dos ácidos hidroxicinâmicos também a crisina e seus isómeros foram identificados em amostras de própolis e relacionados com a atividade biológica deste produto (Lofty, M., 2006).

Markiewicz-Żukowska e colaboradores (Markiewicz-Żukowska et al., 2012) demonstraram a eficácia de extratos etanólicos de própolis e dos seus principais componentes, nomeadamente a crisina e um éster do ácido hidroxicinâmico, como indutores da apoptose de células tumorais.

O efeito protetor dos extratos de própolis e do seu componente a crisina relativamente a patologias do sistema cardiovascular foi recentemente demonstrada por Ohkura e colaboradores (Ohkura et al., 2012).



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Wang e colaboradores desenvolveram um método analítico para a monitorização da galangina em extratos de própolis de forma a permitir a padronização da sua atividade biológica (Wang et al., 2007).

A presença de flavonas, flavanonas, flavanóis e chalconas como principais componentes bioativos de própolis do Irão foi recentemente descrita (Shalmany et al., 2010).

Testou-se a ocorrência de diferenças significativas entre as áreas absolutas de cada pico cromatográfico, através de uma análise de variância (ANOVA) e comparou-se cada média com as restantes através do teste de Tukey. Desta forma foi possível identificar quais os picos cromatográficos cujas áreas apresentavam maiores diferenças significativas para o conjunto de amostras de própolis testadas ou seja, os picos cujas áreas cromatográficas mais variaram de amostra para amostra. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 3.9.

O componente que demonstrou maior capacidade de discriminação entre amostras foi a crisina, seguida da dihidrocrisina, o  $\delta$ -selineno e o rosifoliol e por fim o  $\beta$ -eudesmol e o crisofanol.

As amostras P2 (Vagos I), P5 (Vagos II) e P8 (Ribatejo) são as mais ricas em componentes terpénicos mas enquanto as amostras P2 e P5 apresentam quantidades relativamente baixas de compostos fenólicos o mesmo não acontece com a amostra P8 que também apresenta quantidades significativas de compostos fenólicos.

As amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego) apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos o que é coerente com as atividades antioxidantes registadas para estas amostras. A amostra P8 apresenta no entanto, uma concentração de componentes terpénicos significativamente superior à das amostras P1 e P9 o que lhe poderá conferir uma maior atividade antimicrobiana.

A amostra P6 (Montemor-o-Novo) apresentou concentrações de compostos fenólicos significativamente inferiores às das amostras P1 e P8 mas comparáveis à amostra P9 pelo que se poderá também considerar um própolis com elevado teor de fenólicos.

A amostra P8 apresentou as maiores concentrações de crisina, dihidrocrisina, rosifoliol,  $\delta$ -selineno e  $\beta$ -eudesmol enquanto a amostra P1 foi a mais rica em crisofanol.

A amostra P11 (Caramulo) apresentou as concentrações mais baixas destes seis componentes.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes  
com relevância fisiológica



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

**Tabela 13 - Áreas cromatográficas dos picos com maior relevancia na caraterização e distinção das várias amostras de própolis por GC-MS**

<b>Código</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b><math>\delta</math>-Selineno</b>	<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	<b>Rosifoliol</b>	<b>Dihidrocrisina</b>	<b>Crisina</b>	<b>Crisofanol</b>
P1	Mealhada/Buçaco	12365754 <sup>bcdef</sup>	39475270 <sup>bcde</sup>	15125439 <sup>abcd</sup>	4.27E+08 <sup>ef</sup>	1.82E+08 <sup>fg</sup>	3.85E+08 <sup>e</sup>
P2	Vagos I	17776409 <sup>def</sup>	52586632 <sup>e</sup>	24891718 <sup>cde</sup>	2.42E+08 <sup>bcd</sup>	89190192 <sup>bcde</sup>	1.53E+08 <sup>abc</sup>
P3	Águeda	15345722 <sup>cdef</sup>	43889640 <sup>cde</sup>	24142552 <sup>bcde</sup>	2.21E+08 <sup>abcd</sup>	81636681 <sup>abcd</sup>	1.33E+08 <sup>ab</sup>
P5	Vagos II	18860906 <sup>ef</sup>	47388586 <sup>de</sup>	28845116 <sup>e</sup>	3.14E+08 <sup>de</sup>	1.3E+08 <sup>de</sup>	2.23E+08 <sup>bcd</sup>
P6	Montemor-o-Novo	5322534 <sup>ab</sup>	15494470 <sup>a</sup>	12874355 <sup>abc</sup>	2.96E+08 <sup>cde</sup>	1.37E+08 <sup>ef</sup>	2.61E+08 <sup>cde</sup>
P7	Serra do Buçaco	9089284 <sup>abcd</sup>	27861006 <sup>abcd</sup>	15040914 <sup>abcd</sup>	2.87E+08 <sup>bcde</sup>	1.15E+08 <sup>cde</sup>	2.18E+08 <sup>bcd</sup>
P8	Ribatejo	21424700 <sup>f</sup>	56237744 <sup>e</sup>	45340912 <sup>f</sup>	4.96E+08 <sup>f</sup>	1.92E+08 <sup>g</sup>	3.22E+08 <sup>de</sup>
P9	Vale do Mondego	9622751 <sup>abcde</sup>	24839726 <sup>abc</sup>	16280760 <sup>abcde</sup>	3.27E+08 <sup>de</sup>	1.31E+08 <sup>def</sup>	2.9E+08 <sup>de</sup>
P10	Vila Real	13579091 <sup>bcdef</sup>	40196883 <sup>bcde</sup>	26253594 <sup>de</sup>	1.65E+08 <sup>abc</sup>	68673592 <sup>abc</sup>	1.41E+08 <sup>abc</sup>
P11	Caramulo	2755662 <sup>a</sup>	10195903 <sup>a</sup>	4043961 <sup>a</sup>	93243523 <sup>a</sup>	36672876 <sup>a</sup>	50789471 <sup>a</sup>
P12	Mira	6818242 <sup>abc</sup>	22488748 <sup>ab</sup>	11527835 <sup>ab</sup>	1.46E+08 <sup>ab</sup>	53102431 <sup>ab</sup>	77442078 <sup>a</sup>



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Procurou-se avaliar a existência de correlações entre as áreas médias de cada um dos 18 picos cromatográficos selecionados e as atividades funcionais dos extratos de própolis. Para tal, calcularam-se os coeficientes de correlação de Pearson para cada par de variáveis e identificaram-se os picos cromatográficos cujas áreas médias apresentaram correlações fortes ou muito fortes com o teor de compostos fenólicos totais, a atividade de sequestração do DPPH e a atividade antioxidante de redução férrica.

As áreas cromatográficas médias dos compostos 3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno- [1,2b] -furan-2-ona, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico, tetocrisina, dihidrocrisina, crisina, crisofanol e um derivado da crisina (pico nº16) apresentam correlação forte com as três atividades testadas.

A área cromatográfica do 3-fenil-2-propenoato de 3-fenil-2-propenilo (composto nº 9) apresenta uma correlação forte com a atividade de redução férrica mas não com as restantes atividades.

Por outro lado encontraram-se também correlações fortes e muito fortes entre as áreas dos diferentes compostos selecionados o que indica que alguns componentes tendem a ocorrer em simultâneo em concentrações que variam da mesma forma.

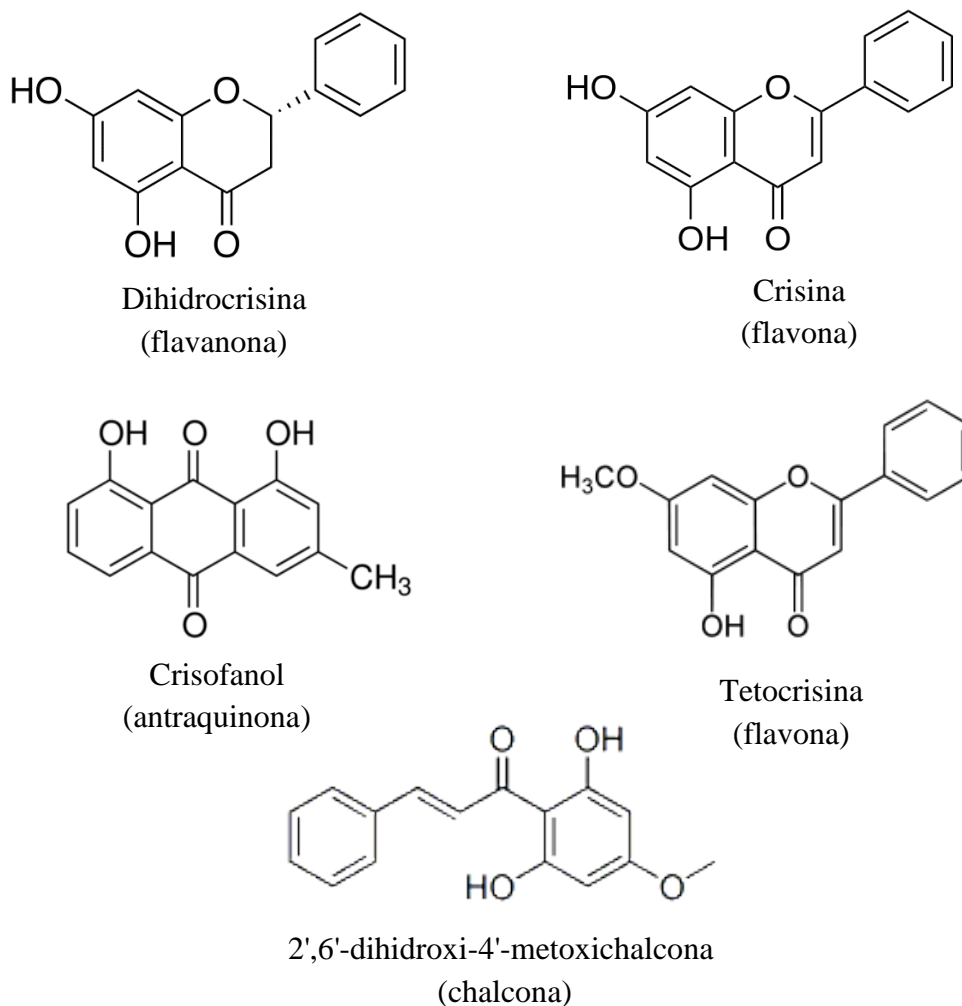
Esta correlação foi observada entre o  $\delta$ -selineno o  $\beta$ -eudesmol e o rosifoliol, entre a 3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno- [1,2b] -furan-2-ona e o ácido 3,4-dimetoxicinâmico, entre o ácido 3,4-dimetoxicinâmico e a tetocrisina, entre o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e o ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico, entre a dihidrocrisina e a crisina, o crisofanol, a galangina e um derivado da crisina,

Os compostos cujas áreas cromatográficas se encontram fortemente correlacionadas devem provir da mesma origem podendo também estar envolvidos em equilíbrios de isomerização.

As amostras P1 a P12 (com exceção da amostra P4 foram também avaliadas quanto à concentração relativa dos 18 compostos selecionados de forma a identificar os seus componentes maioritários. Verificou-se que os componentes maioritários de todos os extratos de própolis estudados foram a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, a dihidrocrisina, a tetocrisina, a crisina e o crisofanol. As estruturas destes cinco componentes principais representam-se na Figura 3.4.



#### Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica



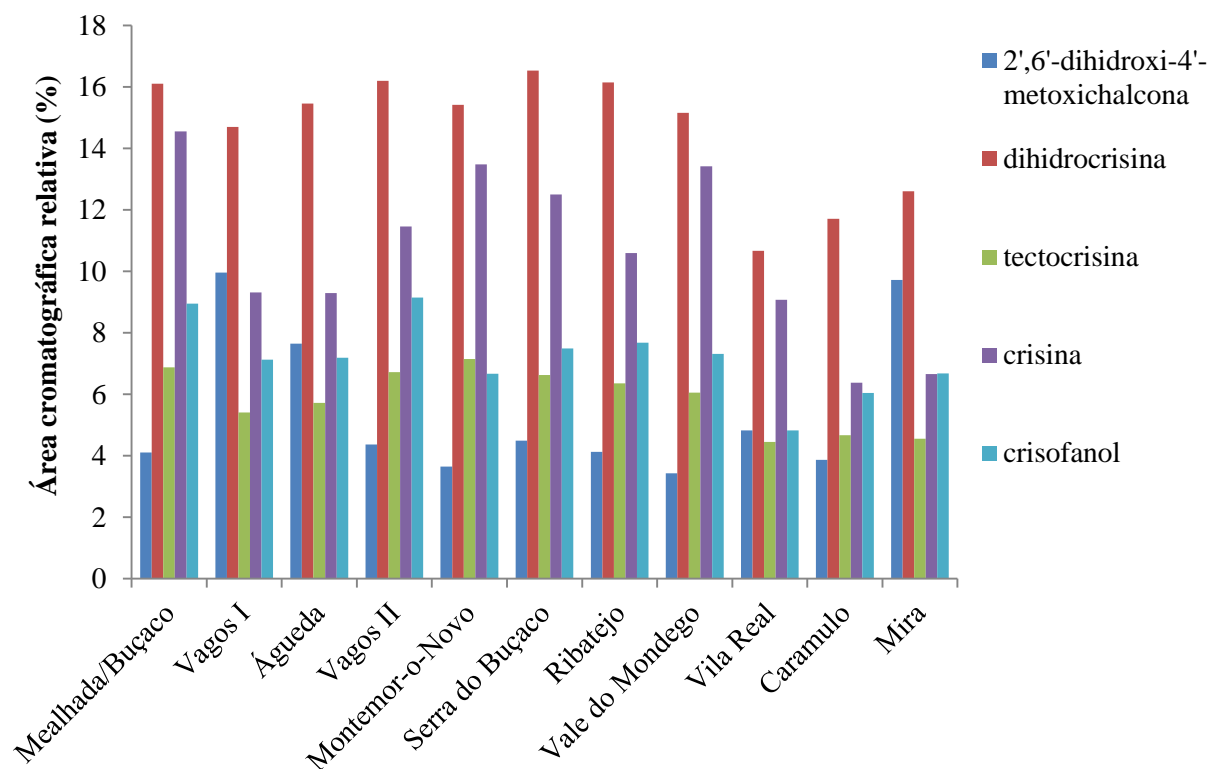
#### Ilustração 4 - Representação da estrutura de alguns Compostos

Como se pode observar na Figura 3.4, os principais componentes dos extratos de própolis analisados neste trabalho apresentam estruturas planares com exceção da dihidrocrisina que possui um carbono com hibridação  $sp^3$ . Todas as estruturas, com exceção da tetocrisina, apresentam dois grupos hidroxilo ligados a um anel aromático característica que lhes permite interagir com espécies oxidantes e radicalares, neutralizando-as por doação de um próton e um eletrão e estabilizar o eletrão desemparelhado por ressonância ou doar um segundo próton e um segundo eletrão rearranjando a estrutura de forma a dar origem a uma molécula neutra e portanto estável.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

As áreas cromatográficas relativas dos picos correspondentes aos cinco componentes principais dos extratos de própolis apresentam-se na Figura 3.5.



**Ilustração 5 - Concentrações relativas dos principais componentes das amostras P1 a P12 com exceção da P4**

Os extratos de própolis que apresentam simultaneamente concentrações elevadas de dihidrocrisina e de crisina foram os que se destacaram nos testes de atividade antioxidante, nomeadamente os extratos das amostras P1 (Mealhada/Buçaco), P6 (Montemor-o-Novo), P7 (Serra do Buçaco), P8 (Ribatejo) e P9 (Vale do Mondego).

As amostras de Vila Real (P10), Caramulo (P11) e Mira (P12) apresentaram concentrações relativas de dihidrocrisina e de crisina claramente inferiores às das restantes amostras e foram também estas três amostras que apresentaram atividade antioxidante mais baixa. A amostra P10 que apresenta uma concentração relativa de crisina superior à das amostras P11 e P12, revelou também uma atividade antioxidante ligeiramente mais elevada que a das amostras P11 e P12 o que é uma evidência do contributo importante da dihidrocrisina e da crisina para as propriedades funcionais do própolis.



## Capítulo 4 – Conclusões

Neste trabalho estudaram-se 12 amostras de própolis provenientes de diferentes regiões de Portugal, e representativas da zona Norte, Centro e Sul, do Litoral e do Interior.

A estas diferenças geográficas correspondem diferenças nas espécies vegetais espontâneas e cultivadas, incluindo aquelas que produzem óleos, resinas e outros componentes vegetais que as abelhas utilizam na produção de própolis.

Esta diversidade contribui para as diferenças nos tipos de própolis produzidos nas diferentes regiões e que é desde logo evidente pela sua aparência que pode ser homogénea ou heterogénea com tonalidades que compreendem o amarelo claro, o laranja avermelhado, o castanho amarelado e o castanho-escuro. Ainda quanto ao seu aspeto o própolis bruto pode ser brilhante e resinoso ou baço e granuloso e pode conter materiais estranhos (contaminantes) que ficaram retidos durante a sua fabricação pelas abelhas.

Estas diferenças na composição vão afetar o rendimento de extração de componentes do própolis quando este é disperso em soluções hidroalcoólicas concentradas. Neste trabalho utilizaram-se soluções hidroalcoólicas a 70% (v/v) e a 96% (v/v), numa razão soluto solvente de 1:10, e efetuou-se a redissolução de resíduo de extração para assegurar uma remoção completa dos componentes solúveis no solvente de extração.

Nestas condições o rendimento de extração oscilou entre 35,2% (m/m), registado para a amostra P4, (Algarve) e 91,6% (m/m), valor obtido para a amostra P9, (Vale do Mondego), sendo a média das diferentes amostras de  $69,5 \pm 14,1$  % (m/m). Este comportamento diverso é uma indicação das diferenças na composição das amostras em termos quantitativos nomeadamente reflete as diferentes quantidades de componentes fenólicos e terpénicos presentes nas amostras pois estes são os componentes mais abundantes no própolis e tipicamente solúveis em soluções hidroalcoólicas.

No resíduo insolúvel ficam retidos os materiais contaminantes de origem vegetal ou animal bem como ceras e outros hidrocarbonetos de grande peso molecular.

O processo de extração evidencia também as diferenças de natureza qualitativa pois os diferentes extratos apresentaram cores diversas entre o amarelo claro e o castanho amarelado, diferentes intensidades de cor e diferentes homogeneidades (aspeto baço ou transparente).





## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Os extratos brutos foram avaliados quanto às suas propriedades funcionais através de três reações específicas: a reação de Folin-Ciocalteu (determinação do teor de compostos fenólicos totais), reação de sequestração do radical DPPH (avaliação da atividade antiradicalar) e reação de redução de iões férricos (atividade antioxidante de redução férrica, FRAP) e os resultados obtidos foram expressos em unidades de volume das soluções hidroalcoólicas, unidades de massa do própolis bruto e unidades de massa de extracto seco.

Registaram-se teores de compostos fenólicos totais no própolis bruto, expressos em equivalentes de ácido gálico, que variaram entre 70,0 mg/g (amostra P3, Águeda) e 141,5 mg/g (amostra P1, Mealhada/Buçaco), ou seja, este conjunto compreende amostras com quantidades moderadas a altas de componentes fenólicos, comparáveis a valores registados noutros países europeus ou em países de outros continentes como o Brasil, o Irão ou a Índia.

A amostra do Algarve apresentou um teor de compostos fenólicos ainda mais baixo (22,8 mg/g) mas a análise dos extratos por GC-MS revelou que os componentes deste extracto eram essencialmente terpénicos pelo que o valor registado na reação de Folin-Ciocalteu corresponde a alguns compostos fenólicos residuais que não foram detetados cromatograficamente ou à presença de compostos terpénicos ou outros que têm a capacidade de reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu apesar de não serem compostos fenólicos.

A atividade de sequestração do radical DPPH foi também expressa em equivalentes de ácido gálico e variou entre 12,7 mg/g (amostra P4, Algarve) e 84,0 mg/g (amostra P9, Vale do Mondego). Esta variável apresentou uma correlação forte com o teor de compostos fenólicos totais apesar de se registarem algumas variações individuais.

Quanto à capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP), esta propriedade expressa em milimoles equivalentes de sulfato ferroso por unidade de massa ou de volume e no caso do própolis bruto obtiveram-se valores entre 0,62 milimoles/g (amostra P4, Algarve) e 2,46 milimoles/g (amostra P7, Serra do Buçaco).

Esta variável também apresentou uma correlação forte com o teor de compostos fenólicos e com a atividade de sequestração do DPPH, mas com um coeficiente de correlação de Pearson ligeiramente mais elevado no caso da atividade antiradicalar. Este



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

resultado pode decorrer da presença de compostos não fenólicos que também contribuem para a atividade antiradicalar e para a atividade redutora férrica.

Os extratos brutos foram fracionados com hexano e acetato de etilo essencialmente para separar a fração terpénica da fração fenólica e para extrair os compostos fenólicos para um solvente mais adequado à sua análise por GC-MS. Efetuou-se a análise de ambas as frações por cromatografia gasosa mas só se apresentam nesta dissertação os resultados referentes à fração de acetato de etilo.

As propriedades funcionais desta fração foram também determinadas tendo-se obtido resultados análogos aos registados para os extratos brutos o que indica que as frações fenólicas são representativas dos compostos com atividade antiradicalar e redutora presentes no extracto bruto.

A análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa confirmou a natureza essencialmente terpénica do extracto de própolis da região de Algarve cujos componentes principais são distintos dos presentes nos restantes extratos. Assim, esta amostra não foi incluída na análise subsequente pois não continha os componentes em análise.

Identificaram-se tentativamente 18 compostos presentes em todas as amostras de própolis analisado variando apenas a sua concentração relativa:  $\delta$ -selineno,  $\beta$ -eudesmol, 3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno-[1,2b]-furan-2-ona, rosifoliol, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona, 3-fenil-2-propenoato de 3-fenil-2-propenilo, 5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (tetocrisina), 5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (crisina), 1,8-dihidroxi-3-metil-9,10-antracenodiona (crisofanol) 3,5,7-trihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (galangina) e três derivados da crisina.

A análise de variância das áreas cromatográficas absolutas e a comparação de médias individuais através do teste de Tukey permitiu identificar os seis componentes que apresentam maiores diferenças significativas entre si dentro deste grupo de amostras e que portanto podem ser úteis na caracterização das amostras de própolis. Estes seis compostos foram o  $\delta$ -selineno, o  $\beta$ -eudesmol, o rosifoliol, a dihidrocrisina, a crisina e o crisofanol.



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

Assim verificou-se que tanto compostos terpénicos como compostos fenólicos variam de forma significativa entre os diferentes extratos fenólicos: ou porque provêm da mesma origem vegetal ou porque participam nas mesmas vias biossintéticas de produção.

Testaram-se também as correlações entre as atividades antioxidantes determinadas e as áreas cromatográficas dos 18 picos selecionados de forma a identificar os componentes do própolis cuja concentração apresenta uma correlação mais forte com a sua atividade antioxidante. Esses componentes foram: a 3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno- [1,2b] -2-furanona, o ácido 3,4-dimetoxicinâmico, o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, o ácido 4-acetoxi-3-metoxicinâmico, a tetocrisina, a dihidrocrisina, a crisina, o crisofanol e um dos derivados da crisina (pico nº16).

Verifica-se portanto que, apesar de alguns compostos terpénicos se terem revelado adequados à distinção de amostras de própolis de diferentes proveniências, são as concentrações dos componentes fenólicos, em particular, dos ácidos hidroxicinâmicos e das dihidroxiflavonas e isómeros que mais fortemente se correlacionam com as atividades funcionais dos extratos e portanto serão estes os compostos que mais contribuem para a bioatividade do própolis.

Finalmente determinaram-se quais os componentes que apresentavam maiores concentrações relativas nos extratos das diferentes amostras: a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, a dihidrocrisina, a tetocrisina, a crisina e o crisofanol.

Assim observa-se que a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, apesar de ser um componente maioritário dos extratos não apresenta uma correlação forte com a sua atividade antioxidante, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos apesar de serem componentes minoritários apresentam uma forte correlação com essa atividade o que indica serem componentes com uma grande atividade antioxidante específica.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar um conjunto de 18 componentes que estão presentes em todas as amostras, apesar das diferentes origens geográficas. Esta observação sugere que as abelhas utilizam um conjunto bastante homogéneo de espécies vegetais para a produção do própolis de forma relativamente independente das restantes espécies presentes; quando essas espécies fomentadoras da produção de própolis estão presentes em abundância obtém-se um própolis de grande



## Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

atividade antioxidante, quando são mais escassas obtém-se um própolis com menor bioatividade.

Por outro lado identificaram-se oito componentes com uma forte correlação com a atividade antioxidante e que portanto se podem utilizar como marcadores dessa mesma atividade e podem funcionar como marcadores da bioatividade de diferentes própolis.



## Capítulo 5- Bibliografia

1. Guzel Ziyatdinova k, Alexander V. Voloshin, Albert Kh, “Application of constant current coulometry for estimation of plasma total antioxidant capacity and his relationship with transition metal contents”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2006; 40: 958-963.
2. Pi-Yueh Chang, Tsu-Lan Wu, Kuo-Chien Tsao, “Cosmetic Liposuction Causes Only Transient Elevation of Acute Inflammatory Response and Does Not Advance to Oxidative and Nitrosative Stress”. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2007; 21: 418– 425.
3. Nalsen Cecilia. *Measurement and Evaluation of Antioxidant Status and Relation to Oxidative Stress in Humans*. Ata Universitatis Upsaliensisn. Uppsala 2006.
4. Di Mascio Paolo, Michael E. Murphy, Helmut Sies. Antioxidant defense systems the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *The American journal of Clinical Nutrition*. 2011.
5. Ghisselli Andrea, Mauro Serafini, Fausta Natella, and Cristina Scaccini “Total antioxidant capacity as a Tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; Vol. 29, No. 11, pp. 1106–1114.
6. Shigenori Kumazawa, Mok-Ryeon Ahn, Takunori Fujimoto, et. al..Radical-scavenging activity and phenolic constituents of própolis from different regions of Argentina. *Natural Produt Research*. 2010; Vol. 24, No. 9: 804–8.
7. Anikó Somogyi, Klára Rosta, Peter Pusztai1, et. al.. Antioxidant measurements. *Physiol.Meas*.2007; 28: R41–R55.
8. Shahidi, F., Janitha P.K., Wanasundra P.D., Phenolic antioxidants critical reviews *Food science and Nutrition*. 1992; V.36: p. 67-103.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

9. Kelishadi Roya, Nourollah Mirghaffari, Parinaz Poursafa, et. al. “Lifestyle and environmental factors associated with inflammation, oxidative stress and insulin resistance in children” *Atherosclerosis* 203.
10. Teixeira Érica Weinstein, Dejair Message, Giuseppina Negri, et. al.. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Própolis Samples. *E CAM*. 2010; 7 (3)307–315.
11. Fraga Cesar G., Mónica Galleano, Sandra V. Verstraeten, et. al.. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 2010; 31; 435–445.
12. Cvek Josipa, C, Ivona Jasprica, Ana Mornar. High-performance thin-layer chromatographic analysis of the phenolic acid and flavonoid content of Croatian própolis samples. *JPC - Journal of Planar Chromatography – Modern*. 2007; 20:6 429.
13. Ramanauskien Kristina, Asta Marija Inknen, Vilma Petrikait, et. al.. Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity of Different Lithuanian Própolis Solutions. (*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*). Volume 2013, Article ID 842985, 5 pages.
14. Bastos Esther, David Guzman, Judith Figueroa, et. al.. Antimicrobial and Physico-Chemical Characterization of Própolis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colombian Andes. *Ata biol. Colomb*. Vol. 16 N. ° 1, 2011 175 – 184.
15. Sócrates Golzio -[www.socratesgolzio.com](http://www.socratesgolzio.com).
16. El Sayed H. El Ashrya, Tarek A. Ahmad. The use of própolis as vaccine’s adjuvant, 2012; 31:201231– 39.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

17. Sforcina Jose Mauricio, Vassya Bankova Própolis: Is there a potential for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology*.2011; 133:253–260.
18. Rabovsky Alexander, John Cuomo, Natalie Eich. Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clínica Chimica Acta*.2006; 371:55–60.
19. Bastos Esther, David Guzman, Judith Figueroa, et. al .Antimicrobial and physico-chemical and characterization of própolis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colombian Andes. *Ata biol. Colomb*.2011; Vol. 16 N. ° 1; 175 – 184.
20. Sawaya Frankland, A. Shimizu, M.T., Cunhe et. al.. Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana do própolis, estudo comparativo de técnicas microbiológicas na avaliação de extratos de própolis obtidos por diferentes métodos. [www.apinetla.com.ar/congreso/t05](http://www.apinetla.com.ar/congreso/t05).
21. Petelinc Tanja, Tomaz Polak, Lea Demsar, et. al.. Fractionation of phenolic compounds extracted from própolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*; 2013, vol.8: 1-8.
22. Serra Josep, Arrate Lacalle Gutiérrez. Antioxidant Activity and Total Phenolics of P rópolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *J Am Oil Chem Soc*. 2011; 88:1387-1395.
23. Trusheva Boryana, Dorina Trunkova, Vassya Bankova. Different extraction methods of biologically active components from própolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*. 2007.1:13 doi: 10.1186/1752-153X-1-13.
24. Siripatrawan Ubonrat, Waranya Vitchayakitti, Romanee Sanguandeeikul. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai própolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science and Technology*.2013; 48: 22.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

25. Burdock G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee própolis. Food and Chemical Toxicology.1998; 36:347-363.
26. Ignat Ioana, Irina Volf, Valentin I. Popa. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Chemistry.2011; 126: 1821– 1835.
27. Teixeira Erica Weinstein, Dejair Message, Giuseppina Negri, et. al... Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian própolis samples. eCAM.2010; 7 :( 3)307–315.
28. Mello Beatriz C. B. S., Miriam D. Hubinger. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green própolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. International Journal of Food Science and Technology. 2012; 47: 2510–2518.
29. Gregoris Elena, Roberto Stevanato. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian própolis. Food and Chemical Toxicology.2010; 48: 76–82.
30. Ramadan A., G. Soliman, Sawsan S. Mahmoud, Salwa M. Nofal, Rehab F. Abdel-Rahman. Evaluation of the safety and antioxidant activities of Crocus sativus and Própolis ethanolic extracts. Journal of Saudi Chemical Society.2012; 16: 13–21.
31. Sharaf S., A. Higazy, A. Hebeish. Própolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. International Journal of Biological Macromolecules. 2013; 59: 408 – 416.





Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

32. Nolkemper Silke, Jurgen Reichling, Karl Heinz Sensch, et. al.. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by própolis extracts. *Phytomedicine*. 2010; 17:132 – 138.
33. Kakino Mamoru, Hiroshi Izuta, Kazuhiro Tsuruma, et. al.. Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green própolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12:192.
34. Selim Erdogan, Burhan Ates, Gokhan Durmaz, et. al.. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia própolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 1592–1597.
35. Boyanova Lyudmila, Galina Gergova, Rossen Nikolov, ET. al.. Activity of Bulgarian própolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 481–483.
36. Valencia Dora, Efrain Alday, Ramon Robles-Zepeda, et. al.. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran própolis. *Food Chemistry*. 2012; 131: 645–651.
37. Zahid Noosheen, Asgar Ali, Yasmeen Siddiqui, et. al.. Efficacy of ethanolic extract of própolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 2013; 79: 69 – 72.
38. Batista Lara Livia Valença, Eliane Aparecida Campesatto, Maria Lysete Bastos de Assis, et. al.. Comparative study of topical green and red própolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2012; 39(6): 515-520.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

39. Valença Isabel, Filipa Morais-Santos, Vera Miranda-Gonçalves, et. al.. Portuguese própolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013; 13:18.
40. Gardana Claudio, Andrea Barbieri, Paolo Simonetti, et. al... Biotransformation strategy to reduce allergens in própolis. Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78: 4654– 4658.
41. Cottica Solange M., Alexandra C. H. F. Sawaya, Marcos N. Eberlin, et. al.. Antioxidant Activity and Composition of Própolis Obtained by Different Methods of Extraction. J. Braz. Chem. Soc. 2011; (22): 5, 929-935.
42. Falcão Soraia I., Andreia Tomás, Nuno Vale, et. al. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese própolis. Industrial Crops and Products. 2013; 49: 805– 812.
43. Bonvehí Josep Serra, Arrate Lacalle Gutierrez. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Própolis from the Basque Country (Northeastern Spain). J Am Oil Chem Soc. 2011; 88:1387–1395.
44. Yajing Li, Minli Chen, Hongzhuan Xuan, et. al.. Effects of Encapsulated Própolis on Blood Glycemic Control, Lipid Metabolism, and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; Article ID 981896, 8 pages.
45. Frozza Caroline Olivieri da Silva, Charlene Silvestrin Celi Garcia, Gabriela Gambato, et. al.. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red própolis. Food and Chemical Toxicology. 2013; 52:137–142.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

46. Mavri Ana, Helena Abramovic, Tomaz Polak, et. al.. Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Própolis. Chemistry and Biodiversity. 2012; Vol. 9: 1545.
47. Rosário Bronze. Apontamentos de Metodologias Analíticas. Faculdade Farmácia Universidade de Lisboa. 2009.
48. Ferreira Célia. Tese de Mestrado Química Forense. Universidade de Coimbra. 2011.
49. Falcão Soraia I., Cristina Freire, Miguel Vilas- Boas. A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of Portuguese própolis. J Am Oil Chem Soc. 2013;10:1007.
50. Silva João Carlos, Sandra Rodrigues, Xesús Feás, et. al.. Antimicrobial activity phenolic profile and role in the inflammation of própolis. Food and Chemical Toxicology. 2012;50:1790– 1795.
51. Valente Maria J., Ana F. Baltazar, Rui Henrique, et. al.. Biological activities of Portuguese própolis: Protection against free Radical - induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell Growth in vitro. Food and Chemical Toxicology. 2011; 49: 86– 92.
52. López Begoña Giménez Cassina, Eduardo Morgado Schmidt, Marcos N. Eberlin, et. al.. Phytochemical markers of different types of red própolis. Food Chemistry. 2014; 146:174–180.
53. Gao Xin, Spencer J. Williams, Owen L. et. al.. Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time-of-flight mass spectra of flavonoids and chalcones. Journal of Chromatography A. 2010; 1217: 8317–8326.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

54. Isidorov Valery A, Lech Szczepaniak. Gas chromatographic retention indices of biologically and environmentally important organic compounds on capillary columns with low-polar stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216: 8998–9007.
55. Isidorov Valery A., Lech Szczepaniak, Sławomir Bakier. Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian própolis. *Food Chemistry*. 2014; 142: 101–106.
56. Popova M., S. Silici, O. Kaftanoglu, et. al . Antibacterial activity of Turkish própolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005; 12: 221–228.
57. Kuropatnicki Andrzej K., Ewelina Szliszka, Wojciech Krol. Historical Aspects of Própolis. *Research in Modern Times. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; Article ID 964149.
58. Kalogeropoulos Nick, Spyros J. Konteles, Elena Troullidou, et. al.. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of própolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 2009; 116: 452– 461.
59. Daleprane Julio Beltrame, Dulcinéia Saes Abdalla. Emerging Roles of Própolis: Antioxidant, Cardioprotective and Antiangiogenic Actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume.2013, Article ID 175135, 8 pages.
60. Markham Kenneth R., Kevin A. Mitchell, Alistair L. Wilkins, et. al.. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand própolis. *Phytochemistry*. 1996; 42: 205-211.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

61. Huang Hsiao-Wen, Chiao-Ping Hsu, Binghuei Barry Yang, et. al.. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. Trends in Food Science and Technology 33.2013; 54-62.
62. Meneghelli Cristiane, Lisiê Silva Dalsasso Joaquim, Giovanni Loos Queiroz Félix, et. al.. Southern Brazilian autumnal própolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. Micro vascular Research.2013; 88:1–11.
63. Chaillou Lucrécia L., Monica A. Nazareno. Bioactivity of própolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. LWT - Food Science and Technology.2009; 42: 1422–1427.
64. Mello Beatriz C. B. S., Miriam D. Hubinger. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green própolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. International Journal of Food Science and Technology.2012; 47: 2510–2518.
65. Almeida Ivone M.C., João C.M. Barreira, M. Beatriz P.P. Oliveira, et. al.. Dietary antioxidant supplements: Benefits of their combined use. Food and Chemical Toxicology.2011; 49: 3232–3237.
66. Hernandez Ingrid Márques, Osmany Cuesta Rubio, Mercedes Campo Fernández, et. al.. Studies on the Constituents of Yellow Cuban Própolis: GC-MS Determination of Triterpenoids and Flavonoids. J.Agric. Food Chem. 2010; 58: 4725–4730.
67. Sang Hui, Na Yuan, Shutong Yao, et. al.. Inhibitory effect of the combination therapy of simvastatin and pinocembrin on atherosclerosis in apo E-deficient mice. Sang et al. Lipids in Health and Disease. 2012; 11: 166.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

68. Rasul Azhar, Faya Martin Millimouno, Wafa Ali Eltay, et. al.. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2013; Article ID 379850:9 pages.
69. Búfalo Michelle Cristiane, Isabel Ferreira, Gustavo Costa, et. al.. Própolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 149: 84–92.
70. Boutabet K., W. Kebsa, M. Alyane, et. al. Polyphenolic fraction of Algerian própolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal Nephrology* 2011; 21(2): 101–106.
71. Maciejewicz w., M. Daniewski, K. Bal, et. al.. GC-MS Identification of the Flavonoid Aglicones Isolated from própolis. *Chromatographia*. 2001; vol53: 343-346.
72. Markham R. Kenneth, Kevin A. Mitchell, Alistair L. Wilkins, et. al.. HPLC and GC-MS identification of the major organic Constituents in New Zealand Própolis. *Phytochemistry*, 1996; vol.42: 205-211.
73. Isidorov Valery A., Lech Szczepaniak, Sławomir Bakier. Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian própolis. *Food Chemistry*. 2014; 142: 101–106.
74. Cheng H., Z.H. Qin, X.F. Guo, et. al.. Geographical origin identification of própolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International* 51.2013813–822.
75. Xin Gao, Spencer Williams, Owen L. Woodman, et. al.. Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time -of- flight mass spectra of flavonoids and chalcones. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217: 8317–8326.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

76. Própolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*.2000; 31: 3-15.
77. Chaillou Lucrécia L., Mónica A. Nazareno. Bioactivity of própolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*.2009; 42: 1422–1427.
78. Thirugnanasampandan R, Sayana Beena Raveendran, R Jayakumar. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian própolis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 651-654.
79. Soraia I. Falcão, Nuno Vale, Paula Gomes, et. al.. Phenolic Profiling of Portuguese Própolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Própolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochem Anal*.2013; 24: 309 – 318.
80. Bulman Zackery, Phuong Le, André O. Hudson, et. al..A novel property of própolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine latone mediated signaling in bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 138: 788 – 797.
81. Hua Xin, Yu-Jie Fu, Yuan-Gang Zu, et. Al... Determination of pinostrobin in rat plasma by LC–MS/MS: Application to Pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011; 56: 841– 845.
82. Cardoso Susana M., Márcio Ribeiro, Ildete L. Ferreira, et. al.. Northeast Portuguese própolis protects against staurosporine and hydrogen Peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 2862– 2868.
83. Sun Li-Ping, Ai-Ling Chen, Hsiao-Chiao Hung, et. al.. Chrysin: A Histone Deacetylase Inhibitor with Anticancer Activity and a Suitable Candidate for the Standardization of Chinese Própolis *J. Agric. Food Chem*. 2012; 60: 11748–11758.



Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

(Benzie e Strain, 1996), *Analytical Biochemistry*, 239; 70-76.

84. Zhou Jinhui, Xiao Feng Xue, et. al.. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in própolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry*. 2009; 115: 1074–1080.

85. Zhang Tong, Ruwida Omar, Weam Siheri, et. al. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterization and dereplication of African própolis. *Talanta*. 2014; 120:181– 190.

86. Cristiane Meneghelli, Lisiê Silva Dalsasso Joaquim, Giovanni Loos Queiroz Félix, et. al..Southern Brazilian autumnal própolis shows anti-angiogenic activity: An “in vitro” and in vivo study *Microvascular Research*.2013; 88: 1– 11.

87. Wagh Vijay D., Própolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials *Advances in Pharmacological Sciences*. Volume 2013, Article ID 308249, 11 pages.

88. Waksmundzka-Hajnos Monika. Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *Journal of Chromatography B*. 1998; 717: 93– 118.

89. Meng Fanrui, Rui Liu, Mei Gao, et. al.. Pinocembrin attenuates blood–brain barrier injury induced by global cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Brain Research* 1391. 2011;93-101.

90. Callegari-Jacques, Sidia M. “Bioestatística: princípios e aplicações” Ed. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p. ISBN: 8536300922

91. Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O, “Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships.” *Curr Med Chem*. 2013; 20(36):4436-50.





Avaliação da actividade antioxidante de extractos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica

92. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001 Feb; 74(2):105-12.
93. Luana Dalbem Rocha, Mariana Costa Monteiro e Anderson Junger Teodoro "Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids - A Review" *Cancer and Clinical Oncology*; Vol. 1, No. 2; 2012 ISSN 1927-4858 E-ISSN 1927-4866 Published by Canadian Center of Science and Education
94. Mahmoud Lotfy "Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease" *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 7,p. 22-31 2006
95. Markiewicz-Żukowska R, Car H, Naliwajko SK, Sawicka D, Szynaka B, Chyczewski L, Isidorov V, Borawska MH "Ethanollic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells". *Adv Med Sci.* 2012; 57(2):208-16. doi: 10.2478/v10039-012-0042-6.
96. Naoki Ohkura, Yuko Takata, Kumiko Ando, et. al. "Propolis and its constituent chrysin inhibit plasminogen activator inhibitor 1 production induced by tumour necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide" *Journal of Apicultural Research* Vol. 51 (2) pp. 179 – 184 DOI 10.3896/IBRA.1.51.2.06, April 2012
97. Wang XP, Lin L, Chen ZL, Ma YY, Pan JG. Quantitative analysis of galangin from propolis in different areas by HPLC 2007 *Zhong Yao Cai.* May; 30(5):560-2.
98. S. khojasteh Shalmany. R. Solhnejad. A. khalili mosavi. A. Taghvamanesh.N. Masnabadi. Chemical Composition of Iran Propolis from Different Regions of Ardebile. *J. Sci. I. A. U (JSIAU).* Summer 2010; Vol 20, No. 76: p. 87-92.